



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

“ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI”

Trabajo de grado previo a la obtención del Título de:

Ingeniero Agropecuario

AUTOR:

Eddy Alexander Falcón Quinatoa

DIRECTOR:

Ing. Raúl Castro

Ibarra – Ecuador

2015

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES
CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

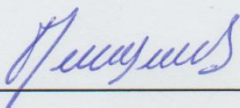
ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE
AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN
VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI.

Tesis presentada por el Sr. Falcón Quinatoa Eddy Alexander, como requisito previo para optar el Título de Ingeniero Agropecuario. Luego de haber revisado minuciosamente, damos fe de que las observaciones y sugerencias emitidas con anterioridad han sido incorporadas satisfactoriamente al presente documento.

APROBADA:

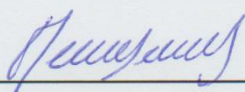
Ing. Raúl Castro

DIRECTOR



Ing. Raúl Castro

BIOMETRISTA



Ibarra – Ecuador

2015

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

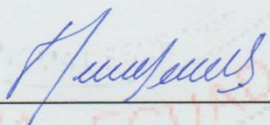
ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE
AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN
VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI.

Tesis revisada por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como
requisito parcial para obtener el Título de:

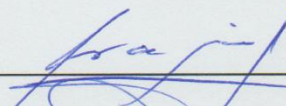
INGENIERO AGROPECUARIO

APROBADA

Ing. Raúl Castro
Director de tesis



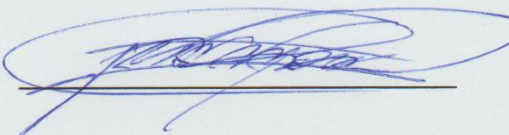
Ing. Juan Pablo Aragón
Asesor de Tesis



Ing. Mónica León
Asesor de Tesis



Ing. Víctor Nájera
Asesor de Tesis



Ibarra – Ecuador

2015



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
Cédula de identidad:	172397673-2		
Apellidos y nombres:	Falcón Quinatoa Eddy Alexander		
Dirección:	Cayambe		
Email:	eafalconq@utn.edu.ec		
Teléfono fijo:	(02)2127700	Teléfono móvil:	0997342123

DATOS DE LA OBRA		
Título:	Análisis de la presencia del viroide ASBVD en el cultivo de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) var. Fuerte, en la comunidad San Vicente de Pusir, cantón Bolívar, provincia del Carchi.	
Autor:	Falcón Quinatoa Eddy Alexander	
Fecha:	09 de junio del 2015	
Solo para trabajos de grado		
Programa:	Pregrado	
Título por el que opta:	Ingeniero Agropecuario	
Director:	Ing. Raúl Castro	

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Falcón Quinatoa Eddy Alexander, con cédula de ciudadanía Nro.172397673-2; en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el repositorio digital institucional y uso del archivo digital en la biblioteca de la universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 09 días del mes de junio del 2015.

EL AUTOR:



Falcón Quinatoa Eddy Alexander

C.I.: 172397673-2



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, **Falcón Quinatoa Eddy Alexander**, con cédula de ciudadanía Nro. 100322466-2 ; manifiesto la voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de propiedad intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominada **“ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI”**, que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniero Agropecuario en la Universidad Técnica del Norte, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

Ibarra, a los 09 días del mes de junio del 2015

Falcón Quinatoa Eddy Alexander

C.I.: 1723976732

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

Guía:FICAYA-UTN

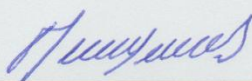
Fecha: Ibarra, a los 09 días del mes de Junio del 2015.

FALCÓN QUINATO A EDDY ALEXANDER. “Análisis de la presencia del viroide ASBVd en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) var. Fuerte, en la comunidad San Vicente de Pusir, cantón Bolívar, provincia del Carchi” / TRABAJO DE GRADO. Ingeniero Agropecuario Universidad Técnica del Norte. Ibarra. EC 41 páginas y 2 Anexos.

DIRECTOR: Ing. Raúl Castro

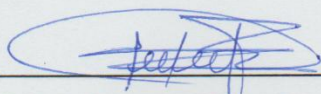
La presente investigación se orientó en generar información mediante técnicas de diagnóstico moleculares, sobre la presencia del viroide ASBVd en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) var. Fuerte en la comunidad San Vicente de Pusir; con la finalidad de aclarar la presencia de mencionado patógeno no convencional y de esta manera contribuir a la producción aguacatera del sector.

Ibarra, a los 09 días del mes de junio del 2015.



Ing. Raúl Castro

Director de Tesis



Falcón Quinatoa Eddy Alexander

Autor

PRESENTACIÓN

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, corresponde exclusivamente al autor; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica del Norte, exclusivamente a la Carrera de Ingeniera Agropecuaria.

El presente trabajo se lo realizó con la finalidad de esclarecer la presencia del *Avocado sunblotch viroid* en los huertos productores de aguacate de la Comunidad San Vicente de Pusir y además como material de apoyo para futuras investigaciones.

EDDY FALCÓN

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por haberme dado la vida y haber permitido llegar hasta este momento tan importante de mi formación académica

Con todo el amor y cariño a mis padres quienes hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro y creer en mí, aunque hemos pasado momentos complicados siempre han estado apoyándome y brindándome todo su cariño, por todo esto les agradezco con todo mi corazón el que estén a mi lado.

A mi hermano y hermana por el apoyo que me brindan día a día en el transcurso de mi vida universitaria y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis...

EDDY FALCÓN

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que estuvieron involucradas e hicieron posible esta investigación, gracias por sus consejos y enseñanzas: Ing. Raúl Castro, director. Ing. Juan Pablo Aragón Ing. Mónica León e Ing. Víctor Nájera, asesores sin su colaboración no hubiese sido posible este proyecto.

A quienes participaron en la parte de experimentación,

Dr. Gustavo Gómez PhD.

Ing. Javier Colimba

Agradezco su apoyo incondicional.

A mi familia en especial a mis padres por su apoyo en todo momento, por sus valores inculcados en mi persona y por darme la oportunidad de tener una educación.

A mis compañeros por apoyarnos mutuamente para la finalización de nuestra formación profesional. De igual forma Jessica gracias por los ánimos en esos momentos de melancolía e histeria de la vida.

EDDY FALCÓN

ÍNDICE

ÍNDICE.....	XI
GLOSARIO.....	XVI
RESUMEN	XVII
SUMMARY.....	XVIII
CAPITULO I.....	1
1.-INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. AGUACATE.....	3
2.1.1. Origen.	3
2.1.2. Producción a nivel mundial.....	3
2.1.2. Situación de la producción de aguacate en el país.....	4
2.1.3. Zonas de producción.	4
2.1.4. Exportaciones del sector.	5
2.1.4. Plagas que atacan al cultivo de aguacate.	5
2.1.4. Enfermedades de importancia económica.....	7
2.2. VIROIDES	8
2.2.1. Características generales.	8
2.2.2. Clasificación de los viroides.	9
2.2.3. Replicación.....	10
2.2.4. Movimiento.	12
2.2.4.1. Movimiento de célula a célula.	13
2.2.4.2. Movimiento a larga distancia.	13
2.2.5. Síntomas y Patogénesis.....	14
2.2.5.1. Expresión de síntomas.....	14
2.2.5.2. Patogénesis.	15
2.3. VIROIDE DEL AGUACATE.....	15
2.3.1. Reseña histórica.....	15
2.3.2. Distribución geográfica.....	16
2.3.3. Hospederos.	16

2.3.4. Variabilidad del ASBVd.	16
2.3.5. Síntomas.	16
2.3.6. Efecto del ambiente.	17
2.3.7. Diseminación.	17
2.3.8. Importancia económica.	18
2.3.9. Control.	18
2.4. PROCESOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS Y VIROIDES.	19
2.4.1. Diagnóstico basado en hibridación molecular.	19
2.4.1.1. Hibridación de ácidos nucleicos (NASH, siglas en inglés).	20
2.4.1.2. Hibridación de improntas.	20
2.4.2. Detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas.	20
CAPÍTULO III.	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	22
3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA LOCALIDAD.	22
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.	22
3.2.1. Materiales de campo.	22
3.2.2. Equipos de oficina.	22
3.2.3. Equipos de laboratorio.	23
3.2.4. Materiales de laboratorio.	23
3.2.5. Insumos de laboratorio.	23
3.3. MÉTODOS.	24
3.3.1. Tipo de investigación.	24
3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL ESTUDIO.	24
3.4.1. Diagnóstico del área de estudio.	24
3.4.2. Delimitación del área de muestreo.	25
3.4.3. Colecta de tejido foliar y frutos de aguacate.	26
3.4.4. Protocolo de procesamiento de muestras y detección del viroide ASBVd.	27
3.3.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.	27
3.3.3.2. Inmovilización de los ácidos nucleicos en la membrana de nylon.	27
3.3.3.3. Impresión de frutos.	28
3.3.3.4. Proceso de hibridación.	28
CAPÍTULO IV.	29

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. DETECCIÓN DEL ASBV _D POR HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO RADIATIVA.	29
CAPÍTULO V	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro1. Superficie cultivada de aguacate	5
Cuadro2. Clasificación de los viroides molecularmente.....	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del movimiento intra e intercelular viroidal de las dos familias.....	11
Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo de los viroides.	12
Figura 3. Delimitación del área de estudio.....	25
Figura 4. Croquis de muestreo de la técnica en zigzag.	25
Figura 5. Esquema del muestreo cinco de oro.....	26
Figura 6. Zonas de muestreo por punto cardinal.	26
Figura 7. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de los ácidos nucleicos, donde se puede observar que ningunas de las muestras se colorearon. (+) Control positivo colocado en la esquina superior derecha de la membrana resulto positiva.....	29
Figura 8. Resultados de la hibridación en la membrana utilizada en el método de impresión, el control ubicado en la parte superior izquierda mostro hibridación positiva al viroide.....	30
Figura 9. Plantas recolectadas en el área de estudio donde se observaron síntomas similares a los ocasionados por ASBVd. A) Clorosis foliar; B) Retraso del crecimiento, C) Fruto bicolor; D) Hojas deformes.	31
Figura 10. Placa de revelado obtenida de la hibridación de la polisonda. Los puntos negros indican la señal positiva de la hibridación.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Detección de virus mediante el uso de polisondas de hibridación no radiactivas. ..	46
Anexo 2. Ubicación del área de estudio.....	47

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Charla de socialización.....	48
Foto 2. Recorridos en campo.....	48
Foto 3. Identificación de árboles.....	48
Foto 4. Recolección de follaje.....	48
Foto 5. Empaque del tejido vegetal.....	48
Foto 6. Identificación de la muestra.....	48
Foto 7. Descongelación de muestras.....	49
Foto 8. Homogenización y pesaje.....	49
Foto 9. Bolsa con tejido.....	49
Foto 10. Tejido triturado.....	49
Foto 11. Ácidos nucleicos.....	49
Foto 12. Inmovilización de ácidos nucleicos.....	49
Foto 13. Corte del fruto.....	50
Foto 14. Impresión de frutos.....	50
Foto 15. Tampón pre hibridación.....	50
Foto 16. Membrana de nylon.....	50
Foto 17. Tubo de hibridación.....	50
Foto 18. Tambor de hibridación.....	50
Foto 19. Horno de hibridación.....	51
Foto 20. Hibridación de la membrana.....	51

GLOSARIO

- **ASBVd:** *Avocado sunblotch viroid*
- **µg:** microgramos
- **µl:** micro litros
- **RNA:** ácido ribonucleico
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **Nt:** nucleótidos
- **RNasa:** ribonucleasa
- **Epinastia:** curvatura hacia abajo de las hojas
- **cDNA:** ADN complementario
- **cRNA:** RNA complementario
- **Tris-HCL:** Tris-Hydrochloride
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **NaCl:** cloruro de sodio
- **SDS:** laurilsulfato sódico
- **SSC:** dodecilsulfato sódico
- **M:** concentración molar
- **Hibridación:** unión de ácidos nucleicos pueden ser DNA o RNA
- **PCR:** Reacción en la Cadena de la Polimerasa.
- **Sonda:** son secuencias de DNA o de RNA, complementarias a aquellas que se quieren detectar
- **Polisonda:** clonación en tándem de varios fragmentos genómicos (sondas).

TÍTULO: “ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL VIROIDE ASBVd EN EL CULTIVO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE, EN LA COMUNIDAD SAN VICENTE DE PUSIR, CANTÓN BOLÍVAR, PROVINCIA DEL CARCHI.”

Autor: Eddy Alexander Falcón Quinatoa

Director de tesis: Ing. Raúl Castro

Año: 2015

RESUMEN

El aguacate en los últimos años ha ganado espacio en la actividad agrícola en el Ecuador convirtiéndose en un producto con un elevado potencial para la exportación. Las privilegiadas condiciones climáticas de la comunidad San Vicente de Pusir hace que la fruta sea ampliamente cultivada. Una limitante que presenta el aguacate para su exportación es la no existencia de estudios sobre el *Avocado sunblotch viroid* o “mancha solar”. El *sunblotch* es una enfermedad de importancia cuarentenaria puede manifestarse de manera sintomática o asintomática, por lo que una detección oportuna es primordial para evitar su diseminación e implementar medidas de control. En este estudio para la detección del viroide se utilizó el método de hibridación molecular no radiactiva tipo dot-blot empleando una sonda marcada con digoxigenina. Para esto se emplearon las técnicas de gota (2 µl de ácido nucleicos) e impresión de pulpa sobre membranas de nylon. Los resultados obtenidos fueron negativos, es decir, no hubo presencia del ASBVd. Adicionalmente los mismos ácidos nucleicos se sometieron a un análisis con una polisonda que contenía la secuencia de los siguientes virus: CMV, ToMV, PVY, TSWV, PepMV, PMoV, AMV, TEV, TOTV, ToCV, TiCV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV y ToLCNDV, hallando la presencia de al menos uno de quince virus en el 16% de las muestras.

Palabras clave: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, virus, polisondas.

TITLE: “ANALYSIS OF THE PRESENCE VIROID ASBVd OF GROWING AVOCADO (*Persea americana* Mill) VAR. FUERTE COMMUNITY IN SAN VICENTE DE PUSIR, CANTON BOLIVAR, PROVINCE OF CARCHI

Author: Eddy Alexander Falcón Quinatoa

Thesis Director: Ing. Raúl Castro

Year: 2015.

SUMMARY

Avocado in recent years has gained ground in agriculture in Ecuador, becoming a product with a high export potential. The privileged climate of the San Vicente de Pusir community, makes the fruit is widely cultivated. A limitation that has avocado for export is the absence of studies on Avocado sunblotch viroid or "sunspot". The sunblotch is a quarantine disease importance can manifest of way symptomatic or asymptomatic, so that early detection is critical to preventing the spread and implement control measures. In this study for detecting viroid was used the method of molecular hybridization nonradioactive type dot-blot using a probe digoxigenin-labeled. To this was used the techniques of gout (2 µl nucleic acid) and printing of pulp in nylon membranes; the results were negative. Further was made a analysis with a poly probe containing the sequence of the following virus: CMV, ToMV, PVY, TSWV, PepMV, PMoV, AMV, TEV, ToTV, ToCV, TICV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV and ToLCNDV; that finding the presence of at least one of fifteen viruses in the 16% of samples.

Keywords: *Avocado sunblotch viroid, Persea americana*, viruses, poly probe.

CAPITULO I

1.-INTRODUCCIÓN

El aguacate en los últimos años ha ganado espacio en la actividad agrícola en el Ecuador desplazando a cultivos tradicionales (maíz, frejol, caña de azúcar) ocupando el cuarto lugar de importancia económica en el sector primario. La producción de la fruta es de mil kilos por hectárea, estacionándose como el quinto país en productividad y el vigésimo noveno en exportación a nivel internacional. La producción aguacatera del país se destina al mercado nacional e internacional, la principal plaza es Colombia, que constituye el 92,69% de las exportaciones ecuatorianas al mundo según los datos de la CORPEI, (2009). La exportación de aguacate es una actividad importante para los productores de San Vicente de Pusir de la provincia del Carchi (Guerra y Urbina, 2009).

El cultivo de aguacate presenta algunas limitantes fitopatológicas entre las que se destaca “la mancha de sol” ocasionada por el *Avocado sunblotch viroid*. Esta enfermedad es considerada actualmente como una limitante para la exportación de esta fruta, a lo cual, se suma la no existencia de estudios documentados sobre esta patología que faciliten la implementación de medidas estratégicas de control fitosanitarias. La mancha solar puede presentarse de manera sintomática o asintomática (no produce síntomas visuales) esta última forma hace más difícil las labores de diagnósticos e identificación del patógeno a nivel de campo. El viroide es de importancia económica para la producción aguacatera y afecta por igual a todos los cultivares disminuyendo el vigor del árbol y la calidad del fruto.

Para el estudio de virus y viroides en frutales se han utilizado técnicas biológicas, pero en los últimos años se han desarrollado métodos moleculares; uno de ellos la hibridación de ácidos nucleicos estos diagnósticos son útiles para este tipo de patógenos en cultivos debido a su especificidad y sensibilidad (Naranjo et al., 2005). Pallás y Sánchez (1998); Pallás et al. (2010), desarrollaron una técnica de estudio para estos agentes conocido como polisonda de hibridación no radiactiva presentando una mayor sensibilidad, disminución de contaminación y un costo menor.

Una vez conocido el peligro que representa el *Avocado sunblotch viroid* a la producción aguacatera es necesario proteger este cultivo en el Ecuador esclareciendo la presencia del viroide en nuestro país, por lo cual, el objetivo general de este estudio fue: “Diagnosticar la

presencia del viroide ASBVd en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill) Var. Fuerte, Comunidad, San Vicente de Pusir, Cantón: Bolívar, Provincia: Carchi”.

Además, se plantearon tres objetivos específicos:

- Determinar la presencia del viroide en las plantas analizadas.
- Caracterizar al agente patógeno.
- Estimar los niveles de incidencia de la enfermedad en el área de estudio.

Por consiguiente se estableció la siguiente hipótesis: En las plantaciones de aguacate de la comunidad de San Vicente de Pusir existe la presencia del *Avocado sunblotch viroid*.

Este estudio se fundamenta en los procesos de investigación científica, en donde, en el Capítulo I identifica el problema del estudio, los objetivos; el Capítulo II desarrolla la revisión de literatura, sobre la importancia del aguacate en el Ecuador, generalidades de los viroides, la descripción del *Avocado sunblotch viroid* y las técnicas de diagnósticos moleculares, así como fundamentos teóricos sobre el estudio; el Capítulo III refiere a: condiciones climáticas del área de trabajo, materiales y métodos aplicados en el estudio y manejo específico del experimento (colecta, extracciones de ácidos nucleicos de los tejidos foliares y el análisis de los mismos); el Capítulo IV, constituye el análisis y discusión de resultados y finalmente, en el Capítulo V se establece las conclusiones y recomendaciones de la investigación.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aguacate

2.1.1. Origen.

El origen y domesticación del aguacate tuvo lugar en América Central y el sur de México. Entre los años 7000 y 8000 AC, culturas antiguas contaban con un buen conocimiento acerca de este fruto y sus diferentes variedades. Posteriormente se cultivaron en África del sur, Israel, Chile, Australia y Estados Unidos en donde se han logrado mejoras genéticas, tanto de factores agronómicos como de calidad (Barrientos y López, 1999; Cerdas, Montero y Díaz, 2006).

2.1.2. Producción a nivel mundial.

El principal productor de aguacate en el continente Asiático es Indonesia, en África lo es Sudáfrica estos continentes aportan un 15 y 17% de la superficie que se cultiva a nivel mundial respectivamente. Los principales países productores en América son: México, Estados Unidos y Chile. Otros productores importantes son Israel, España y Sudáfrica (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2007).

Datos publicados por las Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2012; menciona que el mayor productor de aguacate es México mantiene un 33% de la producción total (1.022 millones de Tm), con más de 120 mil hectáreas. Seguidamente se encuentra Indonesia con el 8% (264 mil Tm). Colombia inicio sus exportaciones con cinco mil hectáreas de cultivo que representan el 6% y Estados Unidos representa 7% de la producción mundial. República Dominicana posee un área de cultivo de cuatro mil hectáreas y tiene una participación del 4% (114 mil Tm). En los últimos años países como Chile y Perú han incursionado en el cultivo de aguacate con 40 mil hectáreas de esta fruta (La Hora, 2013).

2.1.2. Situación de la producción de aguacate en el país.

En Ecuador, la producción de aguacate (*Persea americana* M.) en los últimos años ha evolucionado de ser un cultivo netamente para el consumo nacional para convertirse en un producto con un elevado potencial de exportación (Ponce, 2013).

En el año 2002, en Ecuador se encontraban sembradas 2.290 hectáreas de aguacate como monocultivo y 5.507 hectáreas asociados con otros cultivos. De la superficie total sembrada en el país se cosecharon 1.917 ha de los cultivos solos y 4.056 ha de los sembríos en asocio, con una producción de 6.930 Tm y 2.114 Tm respectivamente, de las que se destinaron 8.670 Tm para la venta. Se estima que en el país el 75% de la superficie cultivada corresponde a la variedad Fuerte y que aproximadamente existen 500 ha plantadas con la variedad Hass (6,41%), mismas que sigue incrementándose con visión de exportación (Servicio de Información Agropecuaria [SICA], 2002).

2.1.3. Zonas de producción.

El aguacate es un producto de elevado potencial tanto en el ámbito productivo como en el exportador, esta fruta puede ser cultivada entre los 1000 y 1900 m.s.n.m.; en muchos lugares a desplazado con facilidad a cultivos considerados tradicionales como maíz, frejol, caña de azúcar entre otros (Perugachi, 2010). Según Vásquez (2008) menciona que “la producción de aguacate en la Sierra ecuatoriana está distribuida principalmente en los valles interandinos de las provincias de Carchi (Mira), Imbabura (Chota y Salinas), Pichincha (Guayllabamba), Tungurahua (Patate y Baños), Azuay (Paute y Gualaceo)” (citado por Juiña, 2013 p. 4).

Una de las especies con mayor consumo en el Ecuador es el Guatemalteco o Fuerte. “El 80% de esta variedad proviene de la zona entre Guayllabamba, en el norte de Pichincha, y el cantón Mira, en el sur del Carchi”, sin embargo, en el callejón interandino se cultiva la variedad nacional o criollo, que es la variedad mexicana. El aguacate nacional tiene una demanda a nivel del Litoral. No presenta importancia para la exportación (El Comercio, 2011). En 2002, III Censo Nacional Agropecuario señala que la superficie cultivada de aguacate en el país se concentra en la parte norte, como se detalla a continuación:

Cuadro1. Superficie cultivada de aguacate

SIERRA NORTE	SIERRA CENTRAL	SIERRA SUR
60%	30%	10%
Carchi: Bolívar, Mira	Tungurahua: Patate, Baños, Pelileo.	Cañar: Azogues
Imbabura: Pimampiro, Ibarra, Cotacachi, Antonio Ante, Urcuquí.		Azuay: Paute, Gualaceo, Santa Isabel
Pichincha: Pedro Moncayo, Quito		Loja: Vilcabamba, Gonzanama, Chaguarpampa, Paltas.

Fuente: Censo Nacional Agropecuario, (2002)

2.1.4. Exportaciones del sector.

El Ecuador está ubicado en un sitio privilegiado para el cultivo de aguacate y se conoce sobre un aumento a nivel mundial en su consumo ya sea por su sabor, textura y/o por las propiedades nutritivas que contiene esta fruta.

El aguacate en Ecuador ha mostrado una alternativa de producción y exportación la cual va tomando mayor importancia año tras año, considerándose como una especie de agro exportación. Las exportaciones totales en el año 2011 fueron de 7 104,94 toneladas con un ingreso de ventas de 458 610 USD. De igual manera para el periodo entre enero y abril del 2012 se exportaron 259 970 USD en aguacate. Este monto supero a los 216 700 USD que se registraron en el mismo lapso de 2011 (Pillajo, 2013).

El país exporta principalmente la variedad Fuerte, sin embargo, en el territorio ecuatoriano se cultivan más de 20 tipos diferentes de aguacate que a su vez son importantes para la ecología de la especie. La producción de aguacate se concentra a lo largo del Callejón Interandino. Entre el principal consumidor del aguacate ecuatoriano está Colombia, que durante el periodo comprendido entre enero de 2007 y diciembre de 2011 represento el 92,69% de las exportaciones de esta fruta hacia el exterior (Pillajo, 2013).

2.1.4. Plagas que atacan al cultivo de aguacate.

La incidencia de plagas en la fruta de aguacate cosechado es un limitante en la recepción del producto en fresco para la exportación, por lo tanto es necesario implantar planes de control y la realización de un monitoreo periódico. Entre las principales agentes están:

- Taladrador del tronco (*Copturomimus persea* Gunthe): este insecto taladra el tronco y ramas las cuales se secan hasta provocar su muerte, su perjuicio se puede expandir hasta el fruto. Su daño se manifiesta por la presencia de aserrín. Se han reportado pérdidas que bordean los 85% en aguacateras atacadas por la plaga (Mariño, 1947 y Bartoli, 2008).
- Talador de la semilla (*Heilipus spp*): plaga de gran importancia, el adulto perfora la cáscara del aguacate en donde deposita los huevos y al emerger sus larvas se alimentan de la pulpa de fruta ocasionando su prematura caída pueden llegar a ocasionar pérdidas de hasta el 100% (CESAVEM, 2008).
- Trips del aguacate (*Heliothrips haemorrhoidalis* Bouche): se distribuye en focos y es frecuente observarlas en ramas con frutos fuertemente atacados. Es una plaga polífaga los daños ocasiona que la epidermis de los frutos y de igual manera de las hojas se engrosen y agrieten (Bernal y Díaz, 2005).
- Picudo del aguacate (*Compsus sp*): la larva se alimenta de raíces y pelos absorbentes. Este daño altera el rendimiento, tamaño y calidad del fruto. En su etapa adulta se alimentan de brotes y frutos tiernos este perjuicio es el más significativo en las plantaciones debido a que la fruta es destinado al consumo en fresco (ICA, 2001).
- Palomilla enrolladora de la hoja (*Platynota spp*): es un gusano de color claro de 1-2 cm de largo que une una hoja nueva con otra. La plaga daña la epidermis inferior de las hojas y ocasiona su secado que se puede extender a todo el árbol (Ibarra, 1929 y Bartoli, 2008).
- Araña cristalina (*Oligonychus perseae*): se ubican en el envés de las hojas; en donde provocan manchas amarillentas. Esta plaga se puede observar en época de verano. Se las puede controlar con la utilización de acaricidas convencionales sólo si el daño es muy severo (Ibarra, 1929; Marticorena y Berrío, 2014).

2.1.4. Enfermedades de importancia económica.

Las enfermedades son otra de las limitantes por cual los productores deben realizar monitoreo y controles efectivos y eficientes. Las enfermedades de importancia económica en aguacate se detallan a continuación:

- Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*): también denominada como viruela los daños se manifiestan en flores, frutos (manchas claras de forma circular), hojas y ramas. Las flores infectadas se ennegrecen o atizonan ocasionando su caída en los frutos provoca el aborto (Bartoli, 2008).
- Roña (*Sphaceloma perseae* Jenk): es la segunda enfermedad en importancia económica detrás de la antracnosis, produce daños a frutos recién fecundados hasta el tamaño regular, también deterior hojas y ramas (Amórtegui, 2001).
- Tristeza o Marchitamiento (*Phytophthora cinnamomi*): es una de las enfermedades más peligrosas para la producción aguacatera, los árboles infectados presentan síntomas de marchitamiento por pudrición de raíces absorbentes, las hojas toman un color amarillento y las puntas pierden dureza (Maldonado, 2006)
- Anillamiento del Pedúnculo: induce al desprendimiento del aguacate que no posee pedúnculo aproximadamente a un centímetro del fruto, produce una especie de ahorcamiento, aparecen zonas necróticas en la corteza y en el fruto se puede observar una tonalidad violeta en mucho de los casos permanecen unidos al pedúnculo (Tokar, 2008).

Otra de las enfermedades presentes en la mayoría de áreas productoras de aguacate es la denominada “**mancha de sol**” producida por el viroide **ASBVd**. Esta enfermedad carece estudios por lo tanto, no ha sido reportado en el Ecuador, convirtiéndose en una necesidad primordial el investigar y a su vez descartar o asegurar su presencia en el país.

2.2. Viroides

2.2.1. Características generales.

Los viroides son agentes infecciosos característicos de las plantas compuestos por pequeñas moléculas de RNA de cadena simple, circulares, con una longitud de 246 a 401nt (Diener, 2003; Tabler y Tsagris, 2004; Flores et al., 2005; Daròs et al., 2006; Ding y Itaya, 2007; Gómez y Pallás, 2013). Las moléculas de RNA viroidal no tienen la capacidad de codificar ninguna proteína y poseen un elevado grado de auto-complementariedad de bases, habitualmente con una proporción en citosina y guanina, lo que concibe una robusta estructura secundaria (Flores et al., 2005).

La sencillez molecular y su genoma reducido se contrarrestan con su capacidad para interactuar con la maquinaria celular del huésped y de esta manera cumplir con todas las funciones requeridas de su ciclo infectivo. Los viroides se replican autónomamente parasitando la maquinaria de sus huéspedes (Diener, 2001; Flores et al., 2005; Ding, 2009; Gómez et al., 2009; Gómez y Pallás, 2013). El ciclo infectivo está exclusivamente mediado por los factores huésped, esto se debe a que son RNAs patogénicos que no poseen la capacidad codificante de proteína, esta particularidad ha permitido que los viroides sean un modelo para analizar distintos aspectos de la biología del RNA; tales como el conocimiento de la relación entre estructura y función del RNA, el transporte intra, intercelular y vascular del RNA o las variaciones transcripcional mediadas por RNA (Flores et al., 2005; Flores et al., 2004; Daròs et al., 2006; Ding y Itaya, 2007; Tsagris et al., 2008; Gómez y Pallás, 2013).

Los viroides se descubrieron y especificaron en los década de los 70 tratando de identificar el agente causal de la enfermedad del tubérculo fusiforme de la papata (PSTVd) (Diener, 1971 y Flores, 2011). Se conocen 30 especies de viroides y numerosas variantes Flores et al, (2001 – 2005), Cuadro 2, se han clasificado en dos familias; la familia *Pospiviroidae*, su especie tipo es el fusiforme de la patata (PSTVd) (Gross et al., 1978), y la familia *Avsunviroidae*, en donde sobresale el viroide del manchando solar del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd) (Symons, 1981).

Los viroides son los patógenos de las plantas más pequeños que se conocen siendo aproximadamente 10 veces menores que el RNA viral reportado; así mismo los virus y viroides son dos grupos completamente diferentes y no existen señales de que tengan relaciones filogenéticas cercanas (Flores, 2000 y Beltrán, 2013).

2.2.2. Clasificación de los viroides.

“La primera clasificación de viroides reportados y secuenciados fue realizada por Putcha, Ramm, y Sanger, (1988), que se basó en la homología de secuencia, tomando arbitrariamente como límite el 60% de homología para la separación de grupos” (Seoane, 2011, p 11).

“Los viroides son la única clase de patógenos sub virales que se replican autónomamente cuya estructura molecular está bien definida. Las características, propiedades funcionales y su origen evolutivo hacen que se difieran de los virus” (Méndez, 2005, p 20). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha establecido un reglamento para la clasificación de los viroides, que se sustenta en el conocimiento de sus secuencias nucleotídicas de las especies informadas, de la identificación de una secuencia central conservadora (CCR) dentro de ellas y de las características del modelo de replicación. Se conocen 30 especies de viroides y numerosas variantes, catalogadas en dos familias; la familia *Pospiviroidae* quienes se replica en el núcleo y poseen CCR y la *Avsunviroidae* que se replica en los cloroplastos y no poseen CCR. Castellano, (2014)

Cuadro2. Clasificación de los viroides molecularmente.

Familia	Género	Abreviatura	Especie
Pospiviroidae	Pospiviroid	PSTVd	Viroide del tubérculo fusiforme de la patata
		TCDVd	Viroide del enanismo clorótico del tomate
		TMVd	Viroide de la planta macho del tomate
		MPVd	Viroide de la papita mejicana
		CEVd	Viroide de la exocortis de los cítricos
		CSVd	Viroide del enanismo del crisantemo
		TASVd	Viroide del enanismo apical del tomate
		IrVd-1	Viroide 1 de iresine
		VCLVd	Viroide latente de columnnea
	Hostuviroid	HSVd	Viroide del enanismo del lúpulo
Pospiviroidae	Cocadviroid	CCVd	Viroide del cadang-cadang del cocotero
		CTiVd	Viroide del tinangaja del cocotero
		HLVd	Viroide latente del lúpulo
		CVd- IV	Viroide IV de los cítricos
	Apscaviroid	ASSVd	Viroide de la piel cicatrizada de la manzana
		CVd-III	Viroide III de los cítricos
		ADFVd	Viroide del fruto picado del manzano
		GYSVd-1	Viroide 1 del moteado amarillo de la vid
		GYSVd-2	Viroide 2 del moteado amarillo de la vid
		CBLVd	Viroide de la hoja curvada de los cítricos
		PCVd	Viroide de los chancros pustulosos del peral
		AGVd	Viroide australiano de la vid
	Coleviroid	CbVd 1	Viroide 1 del coleus blumei
		CbVd 2	Viroide 2 del coleus blumei
		CbVd 3	Viroide 3 del coleus blumei
Avsunviroidae	Avsunviroid	ASBVd	Viroide del manchado solar del aguacate
	Pelamoviroid	PLMVd	Viroide del mosaico latente del melocotonero
		CChMVd	Viroide del moteado clorótico del crisantemo
	Elaviroid	ELVd	Viroide latente de la berenjena

Los viroides se agrupan en dos familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que contienen cinco y tres géneros respectivamente. Las especies tipo de cada género están señaladas en negrita

Fuente: Flores, (2005).

2.2.3. Replicación.

El ciclo de la infección sistémica del viroide, inicia de la siguiente manera: una vez ubicado en la célula inicialmente infectada, debe replicarse en el orgánulo correcto (el cloroplasto para *Avsunviroidae* y el núcleo para *Pospiviroidae*) de la célula, seguidamente invadirá células vecinas a través de los plasmodesmos y posteriormente se dirigirá al floema

para recorrer largas distancias e invadir tejido sano. El ARN viroidal está protegido contra degradación celular en cada uno de los pasos (Ding y Itaya, 2007 y Castellano, 2014).

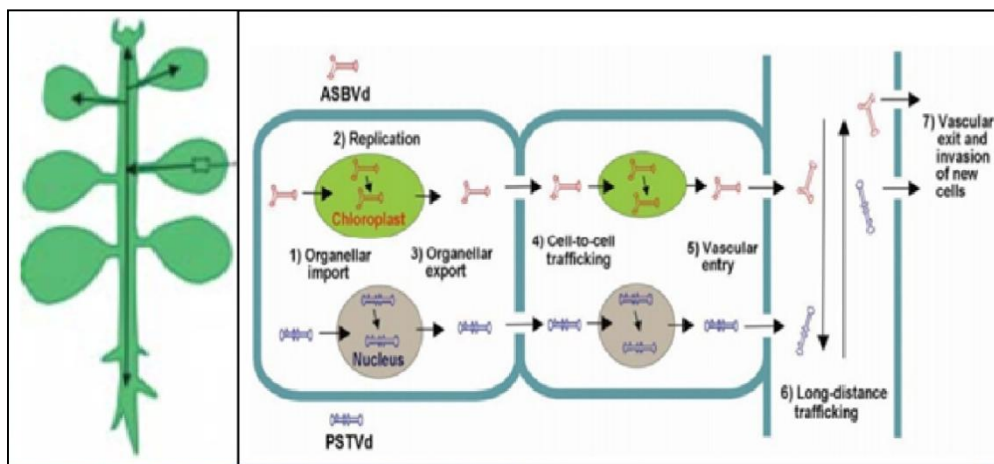


Figura 1. Esquema del movimiento intra e intercelular viroidal de las dos familias.
Fuente: Castellano, 2014

La replicación y propagación son etapas fundamentales y necesarias para el ciclo infeccioso de los viroides. A partir de mínimas cantidades de inóculo los viroides son capaces de invadir tejidos distales de la planta y acumularse en cantidades detectables. Este hecho conlleva que el viroide se multiplique de forma autónoma dentro del huésped al que infecta (Serra, 2009).

Branch y Robertson (1984) aseguran que los viroides se replican siguiendo pautas en las que todos los intermediarios son los ARNs y requieren dos tipos de componentes: los moldes que se transcriben y procesan, y las enzimas que catalizan estas reacciones. Este modelo se denomina “círculo rodante” y está relacionado con la naturaleza circular de los viroides, citado por Seoane, (2011). De forma más específica, se han propuesto dos variantes alternativas para la replicación de los viroides de las dos familias: la asimétrica para los miembros de la familia *Pospiviroidae* quienes se replican en el núcleo y la simétrica para los miembros de la familia *Avsunviroidae* quienes poseen una estructura secundaria ramificada o “cuasi”, a su vez se acumulan y replican en los cloroplastos (Cisterna, Domínguez y Pérez, 2009).

La diferencia entre ambas variantes está determinada por el molde de la polaridad. En la variante asimétrica únicamente las cadenas oligoméricas de polaridad positiva son cortadas y ligadas, mientras que en la simétrica las dos reacciones (corte y ligación) ocurren en las cadenas de ambas polaridades. El proceso de replicación de los viroides según el mecanismo de círculo rodante conlleva tres etapas: (1) transcripción RNA-RNA el cual origina cadenas

viroidales oligoméricas (2), el corte de los oligómeros a monómeros lineales, y (3) circulación de estos últimos (Gas, 2007 y Nohales, 2011).

En el proceso de replicación del círculo rodante actúan tres tipos de enzimas: una RNA polimerasa RNA dependiente que sintetice las moléculas oligoméricas, una RNasa que las procese a unidades de longitud completa y finalmente una RNA ligasa que genere los monómeros circulares terminados. Recordemos que los viroides no poseen la capacidad codificante, estas actividades deben residir en la célula susceptible o en la propia molécula viroidal (Barbosa, 2008).

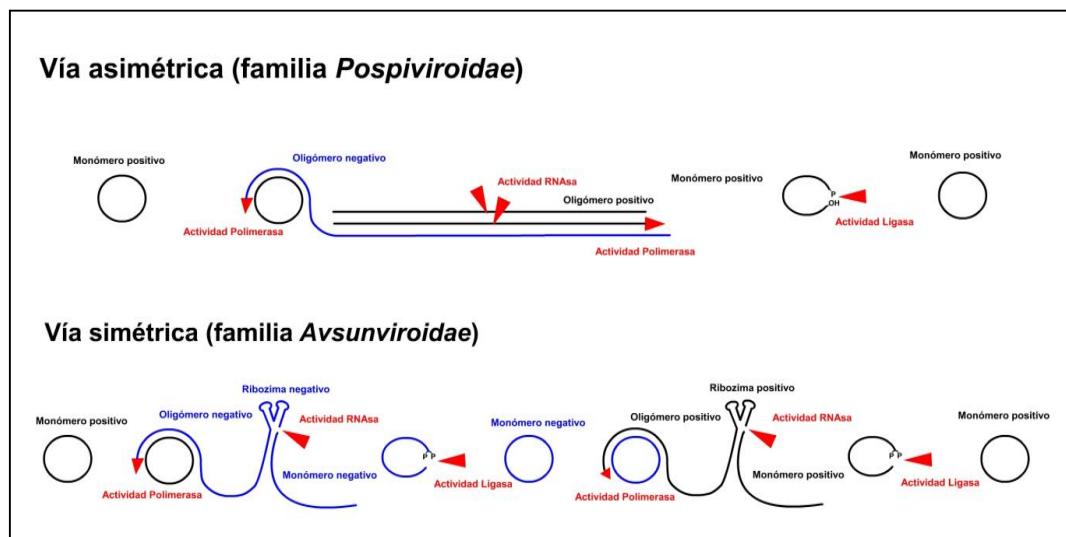


Figura 2. Representación esquemática del ciclo replicativo de los viroides.
Fuente: Flores, (1997).

Los viroides se replican en ausencia del mecanismo de prueba de lectura, generando una alta tasa de variabilidad. Las variantes individuales pueden infectar a un huésped con virulencias distintas. Parece que la planta infectada ejerce una presión de selección entre las innumerables variantes, por lo que la manifestación de la enfermedad podría ser la consecuencia de la interacción población heterogénea de variantes de secuencia con un huésped susceptible (Barbosa, 2008).

2.2.4. Movimiento.

En los últimos años se han dedicado estudios para descubrir los mecanismos por los cuales los viroides se mueven dentro de la planta y los factores del huésped que permiten dicho movimiento. Los viroides al ingresar por heridas deben trascolarse al orgánulo correspondiente para su replicación (cloroplasto para *Avsunviroidae* y el núcleo para *Pospiviroidae*) y posteriormente salir del citoplasma, desde donde se mueven a células vecinas para finalmente

llegar al sistema vascular de la planta e invadir de manera sistémica las partes lejanas de la misma. Debemos tomar en cuenta que los viroides no codifican sus proteínas de movimiento, por lo cual deben interactuar netamente con los factores del huésped para realizar dicha actividad (Nohales, 2011).

2.2.4.1. Movimiento de célula a célula.

El movimiento de célula a célula de los viroides ocurre probablemente vía plasmodesmos que son los orgánulos de interconexión citoplasmática intercelular, este tipo de movimiento se ha observado en ácidos nucleicos y proteínas (Nohales, 2011). “La velocidad de avance de los viroides respecto a RNAs inmóviles sugiere algún tipo de mediación dirigida. Es probable que los viroides se unan a algún factor del huésped para utilizarlo como medio de transporte” (Gómez y Pallás, 2004, p. 10).

Las uniones de las células vegetales no todas son iguales; poseen barreras y filtros en puntos estratégicos para regular el tráfico de macromoléculas a los distintos tejidos. Los meristemas apicales son zonas restringida a la mayoría de virus y viroides. Estudios han demostrado que algunos viroides han llegado a casi invadir este tejido (Rodio et al., 2007). Un posible mecanismo que impide su invasión parece estar intervenido por la maquinaria del silenciamiento genético post-transcripcional (Gómez y Pallas, 2004 y Serra, 2009).

2.2.4.2. Movimiento a larga distancia.

El movimiento a las partes distales de la planta ocurre a través del floema siguiendo la ruta de los foto-asimilados desde los órganos fuente a los órganos sumideros. Este mecanismo es utilizado tanto por virus como por viroides. Existen evidencias que el tráfico floemático de los viroides esta mediado y regulado por factores del huésped (Palukaitis, 1987; Zhu et al., 2001 y Zhong et al., 2007).

La translocación de estos patógenos por el sistema vascular está regulada muy probablemente por las proteínas del huésped, con las cuales formarían complejos capaces de interaccionar con los plasmodesmos y aumentar su límite de exclusión (Owens, Blackburn y Ding, 2001; Gómez y Pallás, 2001 – 2004; Ding e Itaya, 2007 y Carbonell, 2008).

2.2.5. Síntomas y Patogénesis.

El estudio de patologías vegetales y la posterior caracterización de los agentes causales ha sido el inicio para el descubrimiento de los viroides. Los nombres con los cuales han sido asignado a los agentes viroidales hacen referencia a la sintomatología que provoca en la planta. Sin embargo, también existen viroides que no provocan síntomas en sus huéspedes naturales a estos se los denomina “latentes”. Los viroides cuyos síntomas son devastadores, pueden comportarse como infecciones latentes en huéspedes distintos. Estos huéspedes se los califica como “huéspedes tolerantes” y de esta manera se puede deducir que la patogenicidad no es consecuencia del netamente viroide sino de la asociación viroide – huésped (Serra, 2009).

2.2.5.1. Expresión de síntomas.

Los síntomas más comunes resultantes de infecciones causadas por viroides son: atrofia generalizada de la planta, decoloraciones de los vasos conductores de la savia; en las hojas se puede observar arrugas, distorsión, el aparecimiento de manchas cloróticas o necróticas; el fruto puede presentar reducción del tamaño y aparición de manchas decoloradas en su corteza. Además la pérdida de dominancia apical, descamaciones de la corteza, retraso en la floración, entre otros (Da Silva, 2007).

El tipo de síntoma y su intensidad depende de la interacción huésped – viroide y las condiciones ambientales en las que se encuentra la infección. Sin embargo, el resultado final de esta interacción es comúnmente la muerte de la planta infectada (Da Silva, 2007 y Serra, 2009).

La expresión de síntomas también está ligada por las condiciones ambientales en las que se encuentra el huésped infectado. La sintomatología así como la concentración del viroide en la planta se ven favorecidas por la elevada temperatura y la intensidad lumínica (Singh, 1983 -1989). Observándose, las patologías viroidales en mayor porcentaje en las zonas cálidas que en las zonas templada. Esto puede ser atribuido a que las condiciones óptimas para su replicación oscilan a temperaturas elevadas (en general un paso de 20°C a 35°C provoca síntomas) (Singh, 1983 y Serra, 2009).

2.2.5.2. Patogénesis.

“Es la capacidad de ciertos organismos para incitar el desarrollo de una enfermedad infecciosa. La patogénesis es el proceso completo que causa la enfermedad” (Rivera, 1999).

Las enfermedades causadas por los viroides en cultivos de importancia económica fue el punto de partida para su descubrimiento y posteriores investigaciones. La gama de huéspedes es variable algunos infectan y causan enfermedades a un amplio espectro de huéspedes, mientras que otros se reducen a una o pocas especies de un mismo género (Pedaúy, 2011).

Desde años anteriores se tenía conocimiento que la patogénesis es consecuencia de la competencia huésped-patógeno por factores celulares involucrados en el ciclo vital del viroide. En los últimos años se ha propuesto que la respuesta de silenciamiento de RNA (RNAi) del huésped frente a estos patógenos es la responsable de la respuesta patogénica de los viroides (Martínez, 2011).

2.3. Viroide del aguacate

En el cultivo de aguacate se ha reportado la presencia del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), constituido por una molécula de ARN circular, de 247 nucleótidos (Pérez, 2008). Además el ASBVd es la causa de la enfermedad conocida como: “Mancha solar del aguacatero”, este viroide pertenece a la familia *Avsunviroidae* del género *Avsunviroid*. Se replica en los cloroplastos utilizando ribo enzimas que se encuentran en su propia secuencia (Suarez, 2005).

2.3.1. Reseña histórica.

Enfermedad descrita por Desjardins en 1987, ha sido conocida por más de 70 años y se ha reportado en varios países productores de aguacate (Randles, 2003). La mancha solar del aguacatero se observó en 1914 en el sur de California, pero se la catalogó como un desorden fisiológico, posteriormente se reportó en Florida. Se especuló que esta enfermedad podría ser causada por un virus. En 1979, Palukaitis confirma que el agente causal de la mancha solar de aguacate es un viroide (Crisantos, 2011).

2.3.2. Distribución geográfica.

El *Avocado sunblotch viroid* conocido en los países que se cultivan aguacate: Asia, Israel; África, Sudáfrica, Ghana; América del Norte, México, Estados Unidos; América del sur, Perú, Venezuela; Europa, España y Oceanía, Australia (CAB International, 2014).

2.3.3. Hospederos.

El único hospedero natural conocido hasta la actualidad del ASBVd es el aguacate, sin embargo, en estudios realizados con este viroide se ha logrado transmitir de manera experimental a otras especies pertenecientes a la familia *Lauraceae*, a la que pertenece el aguacate (CABI, 2014).

2.3.4. Variabilidad del ASBVd.

El síndrome del *Avocado sunblotch viroid* cubre un patrón complejo de síntomas de enfermedades asociadas con la infección por variantes. En este caso la curva terminal derecha, entre los nucleótidos 105-119 y 120 a 128, se consideran como parte de la zona de mayor variación. Las especies de viroides son denominadas ASBVd-B, ASBVd-V y ASBVd-Sc, son responsables de la expresión de diferentes síntomas como blanqueado, variegado y asintomático, respectivamente (Semancik y Szychowski, 1994; Crisantos, 2011 y Beltrán, 2013).

2.3.5. Síntomas.

Los síntomas causados por los viroides en su hospedante natural, no siempre son distintivos o característicos, sino estos varían su severidad con el cultivar y condiciones ambientales (Singh, 1986). Los indicios visuales de la mancha de sol varían ampliamente y se ven afectados por el estado del cultivo, la variante del viroide y el medio ambiente (Semancik y Szychowski, 1994 y Beltrán, 2013).

Los síntomas de la mancha de sol se puede observar en diferentes órganos de la planta o puede presentarse asintomáticamente. La sintomatología se asocia con las tres variantes antes mencionadas, agrupando una gama de síntomas como blanqueado, variegado y árboles asintomáticos (Semancik y Szychowski, 1994). Una de las principales sintomatologías observadas son líneas amarillentas o naranjas o estrías longitudinales ligeramente hundidas que se presentan en el fruto. En campo los síntomas característicos en ramas son la presencia de

bandas ligeramente hundidas, bien definidas y con tonalidad amarilla o blanca. Las hojas en ocasiones presentan áreas variegadas, blancas o amarillentas y se observan deformaciones poco comunes (Beltrán, 2008). Las plantas con una afectación fuerte tienen un crecimiento decumbente y en ocasiones pueden presentar enanismo y una baja productividad. Los frutos que permanecen verdes, al madurar muestran líneas amarillentas, mientras que los frutos negros sus síntomas son líneas de color rojo. La corteza de los árboles se puede agrietar y las ramas con un patrón rectangular dan la apariencia de piel de cocodrilo (Aniceto, 2013).

Muchas de las veces algunos árboles infectados se recuperan del ataque del ASBVd pero aunque estos aparecen visualmente sanos, sus rendimientos suelen estar por debajo de lo normal, permanecen como portadores asintomáticos (Universidad of California, 2001).

2.3.6. Efecto del ambiente.

Una de las singularidades de las enfermedades producidas por viroides es que muestran una mayor severidad de los síntomas a temperaturas elevadas o cuando existen cambios bruscos de clima (Méndez, 2005).

El *Avocado sunblotch viroid* se mantiene con menor sintomatología durante las épocas de frío y principios de primavera en alturas comprendidas entre 1700 a 2400 m.s.n.m. Sin embargo, a alturas menores de 1700 m.s.n.m., en cualquier huerto y en cualquier clima que se cultive el aguacate puede mostrar la sintomatología antes mencionada. Esto quiere decir que el viroide no le agrada las temperaturas que comprenden entre 8 a 16°C, pero si cuando la temperatura varía de 18 a 32°C en condiciones de campo. También se ha observado en los cultivos con problemas de *sunblotch*; que los árboles enfermos pueden ser sintomáticos únicamente en frutos y en las ramas que tengan una mayor exposición al sol (Campos, 2011).

Los cultivos que presentan una buena nutrición encubren la enfermedad y la sintomatología, es decir puede manifestarse en frutos pero cuando estos han logrado su madures fisiológica, mientras tanto las manchas amarillas pasan desapercibidas totalmente (Campos, 2011).

2.3.7. Diseminación.

“Los viroides son transmitidos de forma mecánica en la mayoría de sus hospedantes. Son capaces de mantenerse por largos periodos de tiempo en los instrumentos de corte o poda,

lo cual constituye posiblemente, la fuente fundamental de la diseminación. También pueden ser transmitidos por injerto, propagación de material infectado y de forma vegetativa” (Méndez, 2005, p. 17). Para algunos viroides como el ASBVd, ha sido posible detectar su transmisión a través de semillas, partes vegetativas, polen y herramientas contaminadas. La mancha solar del aguacate afecta por igual a los cultivares de esta especie (Suárez et al., 2005).

Actualmente no existen estudios científicos que demuestren la existencia de vectores biológicos que estén en la capacidad de transmitir el ASBVd de un cultivo a otro (UCPMG, 2001).

2.3.8. Importancia económica.

La mancha solar del aguacatero es una enfermedad de importancia económica, el mayor impacto económico se ve reflejado en la pérdida y/o reducción de la producción (disminuye el vigor a la planta y la calidad de los frutos), el valor de seleccionar material vegetativo sano y la eliminación de árboles infectados (Saucedo, 2013).

Según Beltrán (2013) menciona que “los árboles infectados pueden reducir su rendimiento en un 27% y tener hasta 52% de frutos no comerciales debido a las manchas que se forman sobre su superficie, demeritando su valor comercial por el mal aspecto que representan”(p. 7). Estudios realizados en árboles de la variedad “Méndez” y “Hass” con síntomas asociados al ASBVd se observó una reducción entre un 83% y 58% respectivamente en comparación con árboles sanos, el peso de 100 frutos de árboles asintomáticos disminuyó en 16-40% “Hass” y 20% “Méndez”, el tamaño de los frutos se redujo en ambas variedades de aguacate (Saucedo, 2013).

2.3.9. Control.

No existen variedades de aguacate resistentes al ASBVd, aunque hay árboles que a pesar de estar infectados con el patógeno sus síntomas no son observados siendo estos por lo tanto portadores asintomáticos de la enfermedad (Beltrán, 2013).

No hay tratamiento curativo por lo cual el método más efectivo de control es la prevención mediante el uso de plantas sanas, certificadas y provenientes de viveros confiables. Además es preciso realizar monitoreo periódicos en el cultivo, eliminar árboles que presenten

síntomas (único medio de control disponible para prevenir contaminación) y sobre todo la desinfección de los materiales de poda (Beltrán, 2013; Saucedo, 2013 y Aniceto, 2013).

2.4. Procesos para el diagnóstico de virus y viroides

Una de las limitantes para la utilización de métodos de diagnóstico inmunológicos y de microscopía en viroides es la carencia de la cápside proteica, por lo cual se ha hecho necesario disponer de otras alternativas de diagnóstico. En años pasados para la detección de viroides se utilizaban métodos biológicos, pero con la evolución de las técnicas moleculares se iniciaron habilidades que se utilizan en la actualidad para el diagnóstico rutinario (Sosa, 2005 y Seoane, 2011).

Inicialmente, el diagnóstico del *Avocado sunblotch viroid* se lo realizó por infección utilizando injerto en plántulas indicadoras de aguacate de las variedades “Mexicano” y/o “Hass”, pero este método era laborioso y muy lento debido a que los primeros síntomas se podían visualizar a los 8 o 24 meses después del injerto. “Resultados más rápidos se obtienen utilizando técnicas de Biología Molecular, cuya sensibilidad aumenta en el siguiente orden: electroforesis en gel de poliacrilamida, hibridación molecular dot-blot con sondas cDNA o cRNA marcadas y RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en Cadena Polimerasa) utilizando cebadores específicos” (Vallejo, 2011, p. 20)

En los últimos años las principales herramientas de diagnóstico para los agentes viroides más utilizados son la electroforesis en gel de poliacrilamida e hibridación de ácidos nucleicos.

2.4.1. Diagnóstico basado en hibridación molecular.

“La técnica de hibridación molecular está basada en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de desnaturalizarse y volver a unirse con nucleótidos complementarios. Esto se realiza bajo condiciones de temperaturas elevadas u otro método desnaturizante que provoque la rotura de los puentes de hidrógeno en las hélices y el posterior enfriamiento que permita la agrupación de hebras de nucleótidos complementarios. Si en el transcurso del proceso se encuentra presentes moléculas de ácidos nucleicos complementarios, tanto de ADN como de ARN llamadas “sondas” se forman puentes de hidrógeno entre las moléculas de nucleótidos y las sondas empleadas” (Seoane, 2011, p. 21).

Las sondas permiten descubrir la presencia de secuencias que se desean identificar, ya que estas se unirán y se detectarán mediante métodos de marcajes radiactivos, calorimétricos entre otras. Conocidas las secuencias clonadas, la síntesis de las mismas se lo realiza mediante la técnica de PCR utilizando cebadores específicos. La hibridación molecular es eficiente para analizar un gran número de muestras. (Derrick et al., 2003 y Seoane, 2011).

2.4.1.1. Hibridación de ácidos nucleicos (NASH, siglas en inglés).

Esta técnica se basa en la interacción de las partes de base (pb) por puentes de hidrógeno que puede ocurrir entre moléculas de simple cadena, polaridad opuesta y de la eficiente similitud en su secuencia nucleotídica. Entre las técnicas más utilizadas está el dot-blot, impresión de tejido *in situ*, entre otros. “Las sondas pueden ser de ADN de simple cadena, ADN de doble cadena, ARN de simple cadena sintetizado y ARN de doble cadena. Pueden ser marcados con una molécula radioactiva (P^{32}), un ligado no isotópico (biotina, digoxigenina) o unirse directamente a una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa)”. La detección de los híbridos formados se puede realizar por autorradiografía, detección enzimática, calorimétrica o quimioluminiscente, en dependencia del marcador empleado (Sosa, 2005 y Méndez, 2005). “El análisis de ácidos nucleicos son útiles para el estudio de virus y viroides en cultivos de importancia económica debido a su especificidad y sensibilidad” (Naranjo et al, 2005, p. 12).

2.4.1.2. Hibridación de improntas.

La hibridación de improntas permite alcanzar resultados con mínima manipulación de las muestras. Esto se consigue aplicando a la membrana improntas de secciones de tallo, hojas o frutos de forma que la savia del tejido (y los viroides) queda depositada en la membrana con lo que se evita la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra. Se puede utilizar para el diagnóstico de rutina ya que permite procesar un gran número de muestras con rapidez, y ofrecer la posibilidad de preparar las membranas en el campo o en el invernadero (Murcia, 2009). “La impresión de tejido es un método sensible, rápido y factible de utilizar para la detección de viroides” (Soto, 2000, p. 35).

2.4.2. Detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas.

La técnica consiste en la clonación en tándem de varios fragmentos genómicos distintos en un mismo vector plasmídico lo cual permite la síntesis en la misma reacción de

transcripción, de una única sonda de RNA o DNA a la que se ha denominado “polisonda” que reconoce a todas las secuencias clonadas; es una habilidad dot-blot (Pallas et al., 2010).

La obtención de la polisonda se realiza amplificando por PCR fragmentos genómicos representativos de la secuencia que se desee detectar. El tamaño mínimo de los mismos puede ser de 50 pares de bases, pero lo recomendable es utilizar alrededor de 200 pares de bases para una mayor sensibilidad. Para la elaboración de cada PCR se construyen cebadores específicos de las secuencias a detectar con los lugares de restricción correspondientes compatibles con el vector que se va a utilizar para la realización de la clonación. Después de realizar las sub-clonaciones necesarias se obtiene un clon los fragmentos genómicos en tándem o a su vez con secuencias específicas de separación para facilitar que no existan impedimentos estéricos que impidan la hibridación con fragmentos adyacentes (Pallas et al., 2010).

El número de sondas individuales que se pueden incluir en la polisonda depende por un lado del tamaño de las sondas individuales y del tamaño del inserto máximo que permita el vector escogido. En trabajos anteriores se han utilizado sin dificultad 1200 bases. Después de haber obtenido el clon se genera la polisonda. “Dependiendo de si se trata de polisondas de RNA o de DNA se utilizará una enzima u otro y un sistema de detección basado en marcaje con oligonucleótidos radiactivos, digoxigenina, biotina o cualquier otro método de marcaje estándar que se escoja” (Pallas et al., 2010, p. 4)

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica de la localidad

La presente investigación se realizó en las huertas aguacateras de la variedad Fuerte en la comunidad de San Vicente de Pusir, ubicada en la Latitud 10.054.920 N UTM y Longitud 829.086 E UTM. El área de estudio presenta las siguientes características agroecológicas:

- **Altitud:** 1500 - 2400 m.s.n.m.
- **Temperatura:** 14-22 °C
- **Precipitación anual:** 419,17 mm/año
- **Suelo:** Franco-Arenoso
- **Humedad relativa:** 70%

Fuente: GAD San Vicente de Pusir, 2013.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materiales de campo.

- Cooler
- Gel-Pack
- Navaja de injerto
- Tijeras de podar
- Fundas herméticas plásticas
- GPS (Global Positioning System)
- Libro de campo
- Esferográfico indeleble
- Etiquetas de identificación

3.2.2. Equipos de oficina.

- Computadora
- Cámara fotográfica
- Papel bond (Formato A4)

- Impresora
- Lápiz
- Borrador

3.2.3. Equipos de laboratorio.

- Agitador magnético
- Balanza electrónica
- Medidor de pH
- Centrifuga
- Congelador
- Horno de luz ultravioleta
- Horno de hibridación
- Sistema de captación de imágenes

3.2.4. Materiales de laboratorio

- Bisturí
- Micro pipetas
- Puntas de micro pipetas 10 μ l
- Puntas de micro pipetas 0,1-10 μ l
- Guantes
- Vasos de precipitación 500 ml
- Tubos eppendorf 2 ml
- Membrana de nylon con carga positiva
- Gradillas para tubos eppendorf
- Papel aluminio

3.2.5. Insumos de laboratorio.

- Agua destilada
- EDTA
- SDS
- Jabón líquido
- Alcohol 98, 5%

- Formamida
- N-Lauroylsarcosine
- Blocking Reagent Solution
- Ácido maleico
- Anti-digoxigenin-AP Fab fragments
- Tween 20
- Sonda para el *Avocado sunblotch viroid*
- Polisonda con la secuencia genética de quince virus

3.3. Métodos

El objeto de la investigación fue diagnosticar la presencia del *Avocado sunblotch viroid* utilizando el método de hibridación molecular no radiactivo tipo dot-blot (técnica de gota e impresión en membranas de nylon). El material vegetativo se recolectó en los huertos de la comunidad de San Vicente de Pusir, perteneciente al Cantón Bolívar. Se ejecutaron recorridos de campo, identificando y diagnosticando plantaciones con presuntos síntomas del viroide.

3.3.1. Tipo de investigación.

Esta investigación se cataloga como básica, con enfoque cuantitativo, de tipo exploratoria. El estudio maneja una línea no experimental por lo cual, el diseño adecuado es transeccional ya que no existe manipulación de variables y solo se limita a observar el fenómeno en su ambiente natural para posteriormente ser analizado (Ruiz, 2001; Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

3.4. Manejo específico del estudio

3.4.1. Diagnóstico del área de estudio.

Con la finalidad de conocer el estado actual y la presencia del *sunblotch*, la investigación inició con una charla a los productores de aguacate de la comunidad, para dar a conocer la importancia, el peligro y los síntomas que ocasiona esta enfermedad en el cultivo. Luego de conocer esta información los agricultores confirmaron la presencia de sintomatologías similares a las producidas por el viroide en sus huertas.

Además, se realizaron recorridos de campo en las huertas productoras de aguacate con el propósito de conocer aspectos principalmente como el manejo de las plantaciones, y

verificación de los posibles síntomas asociados al *sunblotch* en las plantas. Esto permitió observar la existencia de síntomas que se asemejan a los ocasionados por el viroide con lo que se confirmó la posible presencia del agente patógeno.

3.4.2. Delimitación del área de muestreo.

Para la delimitación del área de muestreo se tomó en cuenta la dirección del viento y cortinas de protección (Senasica ,2012); debido a que el viento influye en la diseminación de polen y al no existir cortinas rompevientos se incrementa el porcentaje de contaminación del patógeno entre plantaciones. Conocido lo anterior, las 120 hectáreas de aguacate de la comunidad se dividieron en 14 parcelas procurando que no se superpongan una a otra. Cada una de ellas contenía un área aproximada de 9 hectáreas.



Figura 3. Delimitación del área de estudio.

Posteriormente se utilizó la técnica en zigzag totalmente al azar recomendada por Normex, (2012), con el propósito que las parcelas elegidas estén distribuidas de tal forma que cubran la mayor parte del área a muestrear. De esta manera se ubicaron las seis parcelas donde se realizó la recolecta del material vegetal.

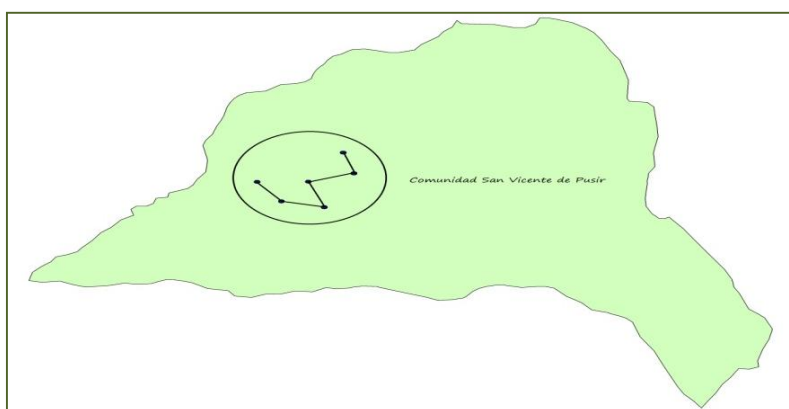


Figura 4. Croquis de muestreo de la técnica en zigzag.

Definido los sitios de trabajo se procedió a aplicar la técnica de muestreo denominado “cinco de oro” o “X” (Loddo, 2000 y Senasica, 2012); la cual consiste en muestrear en cada esquina de la parcela y otra en el centro de la misma (cinco sitios por parcela), esto permitió cubrir una mayor área y obtener muestras con una mayor representatividad.

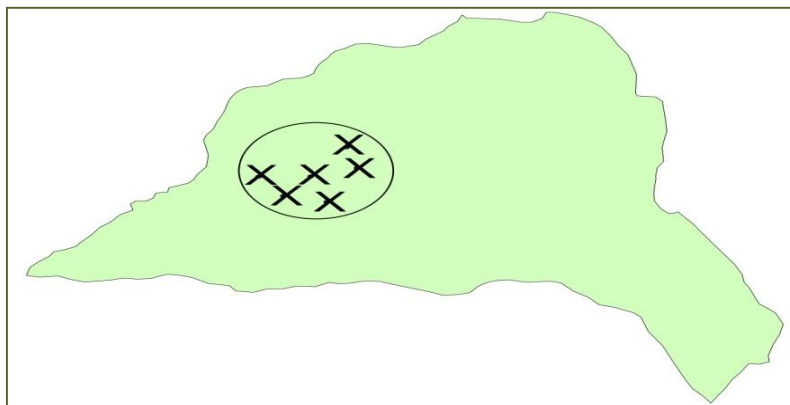


Figura 5. Esquema del muestreo cinco de oro.

Una vez finalizado el proceso de delimitación del área, se obtuvieron 30 puntos de muestreo y en cada uno de los ellos se identificaron cinco árboles con síntomas presumibles del *Avocado sunblotch viroid*. Por consiguiente, estableciendo 150 individuos a ser analizados y cada una de estas unidades se identificó dentro de las parcelas con ayuda de un spray de color azul.

3.4.3. Colecta de tejido foliar y frutos de aguacate.

Se realizó un muestreo dirigido que consistió en tomar tejido vegetal de las plantas que mostraban presumibles síntomas de la enfermedad (Vallejo, 2011). En cada uno de los árboles se utilizó la técnica recomendada por Salazar, (2002) y Beltrán, (2013); misma que consiste en tomar material vegetal de los cuatro puntos cardinales con la finalidad de obtener una muestra compuesta (dos hojas por punto). Las muestras se colocaron en fundas plásticas con su respectiva leyenda de identificación.

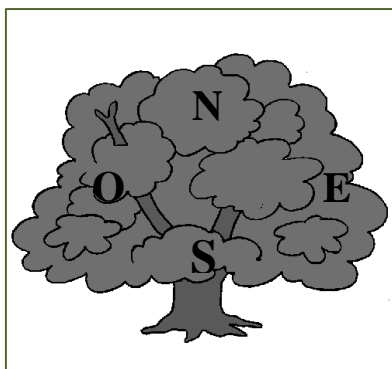


Figura 6. Zonas de muestreo por punto cardinal.

Para los frutos se manejó el protocolo de Normex, (2012); es decir se colectaron frutos de la parte media del árbol y que no se encontraban expuestos a los rayos directos del sol, ni en la parte interna de la planta.

Las muestras, tanto de hojas como de frutos se coloraron en un cooler refrigerado para evitar la deshidratación y posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de fito-diagnóstico de la Universidad Técnica del Norte en donde se almacenaron en un refrigerador a -20 °C hasta su posterior análisis.

Las muestras recolectadas en la comunidad de San Vicente de Pusir, se distribuyeron de la siguiente manera: 136 ejemplares de hojas y 41 frutos; obteniendo un total 177 muestras de aguacate.

3.4.4. Protocolo de procesamiento de muestras y detección del viroide ASBVd.

3.3.4.1. Extracción de ácidos nucleicos.

En esta investigación para la preparación de los extractos a analizar (extracción de ácidos nucleicos) se utilizó el método descrito por Martínez, (2011) con algunas modificaciones como a continuación se describe:

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con agua limpia adicionando jabón líquido con una dosis de 1ml/l. Se homogenizó 1 gramo de tejido vegetal (hojas), se inició a triturar en 3 ml de tampón de extracción (5 mM EDTA pH 7.0; 50 mM SDS) en una bolsa sellada. Se cortó la bolsa con el tejido triturado y se transfirió 1,5 ml del homogenizado a un tubo eppendorf de 2ml. Seguidamente se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm.

3.3.3.2. Inmovilización de los ácidos nucleicos en la membrana de nylon.

Para colocar los ácidos nucleicos en la membrana se marcaron cuadros de 0,5 cm² y en el centro se depositaron 2 µl de sobrenadante. Cada muestra se aplicó sobre la membrana de nylon (por triplicado) y seguidamente la membrana se dejó secar a temperatura ambiente por el lapso de una hora.

3.3.3.3. Impresión de frutos.

Para el protocolo de impresión, los frutos fueron lavados con agua corriente por un minuto. Los cortes se realizaron con ayuda de un bisturí (se desinfecto con alcohol al 98,5%.) y se presionaron directamente sobre la membrana de nylon, se dejó secar a temperatura ambiente por un tiempo estimado de una hora.

3.3.3.4. Proceso de hibridación.

Se empleó el protocolo de detección de virus y viroides en plantas mediante el uso de sondas de ARN de hibridación no radiactivas (Pallás et al., 2010), desarrollado en el laboratorio de virología molecular del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en Valencia, España.

Se inició por incubar la membrana con un tampón de hibridación (50% formamida, SSC 5x, 0,1% N-Lauroylsarcosine, 0,02% SDS, Blocking Reagent Solution) a 68°C durante 1 hora. Luego se incubó toda la noche con la sonda diluida en dicho tampón a 68°C. Transcurrido este tiempo la membrana se volvió a lavar dos veces durante 5 minutos en SSC 2X/SDS 0,1% a temperatura ambiente seguido de dos lavados de 15 minutos a 68°C en SSC 0,1X/SDS 0,1%.

Seguidamente la membrana se incubó 5 minutos en tampón de lavado (TL: 0.1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico; 0,3% Tween 20), a continuación se bloqueó durante 30 minutos con 0,1 M ácido maleico pH 7,5; 0,15 M cloruro sódico + Blocking 1X. Finalmente la membrana se incubó con el anticuerpo durante 30 minutos (Anti digoxigenin-AP Fabfragments (1:10000)).

Por último, la membrana se lavó con el TL dos veces durante 15 minutos, y 5 minutos con un tampón que estaba compuesto por 0,1 M Tris pH 9.5, 0.1 M NaCl y se incubó con el sustrato disuelto, en este mismo tampón 5 minutos. Al final, la membrana se expuso a una película autorradiográfica durante 25 minutos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos en el estudio.

4.1. Detección del ASBVd por hibridación molecular no radiactiva.

Una vez extraídos los ácidos nucleicos de las hojas de los árboles posibles sintomáticos, se sometió al análisis de hibridación molecular utilizando una sonda específica para el viroide ASBVd, con la finalidad de determinar la presencia o ausencia del patógeno en estudio. Una vez realizado el respectivo análisis y tal como puede observarse en la figura.7, todas las muestras resultaron negativas a la hibridación molecular puesto que todos los puntos son incoloros notándose claramente una notada diferencia con la marca de control positivo (esquina superior derecha de la membrana Fig.7). Idénticos resultados se obtuvieron en una segunda membrana, con lo que se reafirma la posibilidad que el viroide ASBVd no esté presente en las plantaciones de aguacate de la comunidad de San Vicente de Pusir.

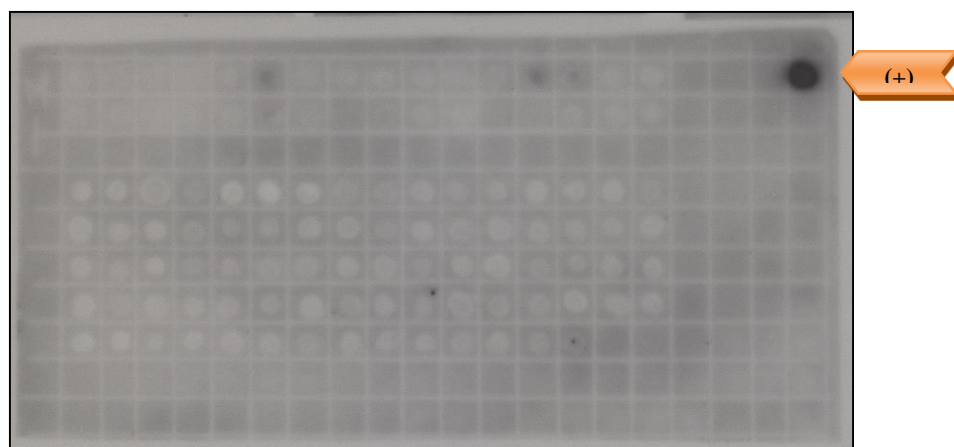


Figura 7. Placa de revelado obtenida a partir de la hibridación de los ácidos nucleicos, donde se puede observar que ningunas de las muestras se colorearon. (+) Control positivo colocado en la esquina superior derecha de la membrana resulto positiva.

De la misma manera se consiguieron resultados negativos en la membrana utilizada en el protocolo de impresión de frutos (Fig. 8), es decir, no existe la presencia del *sunblotch* en las muestras analizadas.

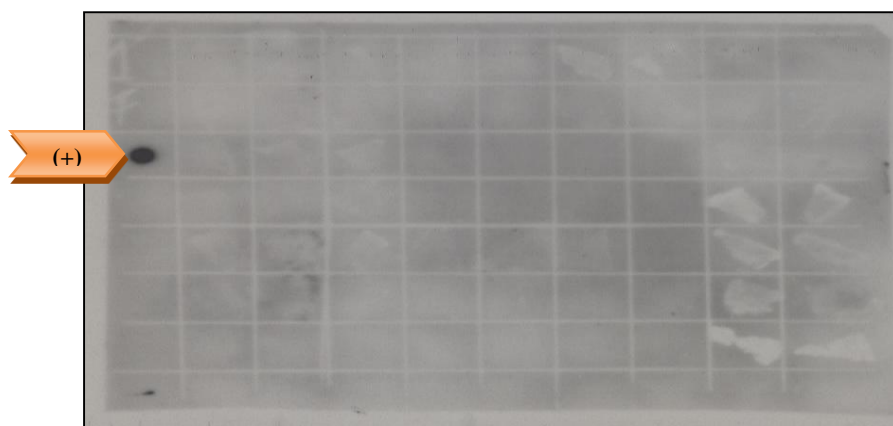


Figura 8. Resultados de la hibridación en la membrana utilizada en el método de impresión, el control ubicado en la parte superior izquierda mostro hibridación positiva al viroide.

En este punto es importante destacar la coherencia de los resultados obtenidos ya que las muestras analizadas resultaron negativas para ASBVd, cuanto a nivel de hoja como de fruto lo que otorga un mayor grado de confianza a los análisis. Por lo tanto, al no estar presente el viroide en el área de estudio los consecutivos objetivos específicos no fueron posibles cumplirlos.

Los resultados obtenidos en esta investigación no coinciden con los encontrados por Crisantos, (2011) y Beltrán, (2013) quienes en estudios similares reportan la presencia del *sunblotch* en plantas de aguacate con síntomas similares a los observados en comunidad de San Vicente de Pusir (Fig. 8). Por otra parte, Vallejo (2011) detectó al viroide en un mayor porcentaje en hojas cloróticas, esta podría ser la una causa para que el viroide no haya sido detectado en razón que en un mayor porcentaje de las muestras colectadas mostraban síntomas de deformación y más no de clorosis.

Sin embargo, parece más lógico asumir que tal y como ocurre frecuentemente en otros pato-sistemas, la expresión final de los síntomas está estrechamente ligada a las condiciones ambientales, y por lo tanto es frecuente que en diferentes entornos distintos agentes patogénicos induzcan síntomas similares. Dando como resultado que los síntomas que podrían ser asumidos como característicos de la infección por *Avocado sunblotch viroid* estén asociados con otros patógenos (Gómez y Pallas, 2013).

Otra de las posibles causas para no haber podido detectar al viroide pueden ser que los síntomas que se presumían de este patógeno (retraso de crecimiento, clorosis y deformaciones) pudiesen ser producto de posibles deficiencias nutricionales de macro y micro nutrientes (Bernal et al., 2008).



Figura 9. Plantas recolectadas en el área de estudio donde se observaron síntomas similares a los ocasionados por ASBVd. A) Clorosis foliar; B) Retraso del crecimiento, C) Fruto bicolor; D) Hojas deformes.

En cuanto a la técnica de diagnóstico utilizada en esta investigación, Acheampong et al. (2008) mencionan que una baja concentración del viroide en el tejido foliar a analizar puede ocasionar que la sensibilidad de la hibridación se vea afectada. En primera instancia esta podría ser la razón por la cual no se pudo encontrar al viroide, sin embargo, esto no pudo haber sucedido ya que Semancik (2003) y Vallejo (2011) mencionan que el agente infeccioso se encuentra distribuido ampliamente en toda la planta (órganos y tejidos), localizándose mayores concentraciones del patógeno en tejidos sintomáticos. Por lo tanto, de haber existido el viroide en las muestras analizadas la técnica hubiese confirmado la presencia del mismo; ya que se rige por el principio del todo o nada, es decir, hay o no hay presencia de una entidad viroidal particular, dada la alta sensibilidad de esta prueba. Vaca, Jhon y López (2011). Esto es corroborado por Rojas y Barrera (2007) quienes lograron detectar al viroide ASBVd en el aguacate utilizando esta técnica, por lo cual recomiendan su uso para análisis de virus y viroides.

Vaca, Jhon y López (2011) asegura que la sensibilidad de la hibridación tipo dot-blot es mayor que la PCR, independientemente del estado del ciclo infectivo del patógeno, pues detecta al agente infeccioso esté replicándose o no. Mientras que la PCR requiere que haya abundantes copias del genoma viral que permitan amplificar un fragmento de RNA de un tamaño esperado; en estudios posteriores Beltrán (2013) y Hernández et al. (2014) han

demostrado que la diferencia de efectividad entre la técnica de hibridación dot-blot es mínima en comparación con la PCR, por lo tanto recomiendan el uso de este método para diagnósticos masivos.

Reafirmando con lo manifestado anteriormente la hibridación molecular dot-blot posee ventajas tecnológicas y económicas sobre ensayos de PCR refiriéndose básicamente, a la factibilidad de manipulación, minimización de la contaminación, los costos de infraestructura (Iglesia, Arocha, Peralta y Álvarez, 2005). Además, permite trabajar con numerosas cantidades de muestras sospechosas infectadas de viroides (Vaca, Jhon y López, 2011). La hibridación molecular es una técnica de diagnóstico confiable y sólido para detección de virus y viroides que proporciona un medio más económico y rápido para detectar (Sánchez y Navarro, 1998; Acheampong, 2008; Pallas et al, 2010 y Beltrán, 2013).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los síntomas en frutos y hojas de los árboles analizados en la investigación no están asociados con el *Avocado sunblotch viroid*, ya que en ninguna de las muestras existió hibridación para la sonda. El ASBVd no se encuentra presente en forma sintomática ni asintomática en las plantaciones de aguacate en el área de estudio.
- En un estudio anexo, las mismas muestras se sometieron a un análisis con una polisonda manifestando la presencia de al menos uno de los 15 virus en el 16 % de las muestras (Anexo. 1). Se puede asumir que los síntomas observados que se presumían estar asociados al ASBVd pueden ser causados por uno de estos virus.
- Se ha detectado por primera vez en Ecuador la presencia de agentes virales en el cultivo de aguacate que podrían estar afectando la producción de esta fruta.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales con la utilización de otra técnica de diagnóstico molecular, a fin de confirmar la ausencia del viroide.
- Una vez establecida la presencia de al menos uno de los quince virus de la polisonda. Se recomienda hacer investigaciones en las cuales se trate de determinar el tipo de agente viral que está afectando las plantaciones de aguacate en San Vicente de Pusir.
- Efectuar estudios sobre caracterización, sintomatología, medios de diseminación y malezas del o los agentes virales que afectan las plantaciones de aguacate en el área de estudio.
- Extender el diagnóstico de virus a las zonas productoras de aguacate de Imbabura y Carchi con la finalidad de conocer si existe la incidencia de estos patógenos en otras localidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Acheampong, A., Akromah, R., Ofori, F., Takrama, J., y Zeidan, M. (2008). Is there Avocado sunblotch Viroid in Ghana?. *African Journal of Biotechnology*, 7(20).
- Amórtegui, I. 2001. El cultivo del Aguacate, Módulo Educativo para el Desarrollo Tecnológico de la Comunidad Rural. Editorial El Poir., Ibagué. PE. p. 7, 14,15.
- Aniceto, C., y Myrna, A. (2013). Desarrollo de un modelo de certificación de viveros de aguacate (*Persea americana* Mill.), 'Hass' y 'Méndez', libres de Avocado sunblotch viroid (ASBVd). (Tesis Maestría en Ciencias, especialista en Fitopatología). Colegio de Posgraduados Montecillo-México.
- Barbosa, C. D. (17 de febrero de 2008). Biología en internet. Recuperado el 1 de agosto de 2014, de Biología en internet:<http://www.biologia-en-internet.com/biologia/revista/divulgacion/replicacion-de-los-viroides/>.
- Barrientos, A. y López, L. (1999). Historia y Genética Del Aguacate. Recuperado el 2014, de: Avocado source: www.avocadosource.com.
- Bartoli, A., & Ángel, J. (2008). *Manual técnico del cultivo de aguacate Hass (Persea americana L.)*. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. Cortes, Honduras, 43p.
- Beltrán P. (2008). El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias Colegio de Posgrado. 68 p.
- Beltrán, P. (2013). El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: detección y manejo (Tesis doctoral). Colegio de Posgraduados. Montecillo-México.
- Bernal, J. y Díaz, C. (2005) Manual técnico No. 5: Tecnología para el cultivo del Aguacate. Colombia: Ed. Produmedios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Río Negro, Antioquia. (P. 241).
- Bernal, J., Diez, C., Tamayo, A., Córdoba, O., y Londoño, M. (2008). Tecnología para el cultivo del aguacate (Vol. 5). CORPOICA.

- CAB INTERNATIONAL. (2014). CABI. Recuperado el 12 de Agosto de 2014, de CABI:<http://www.cabi.org/cpc/?compid=1&dsid=8083&loadmodule=datasheet&page=868&site=161>.
- Campos, R., Santa Cruz, U., Rivera, G., y Flórez, M. (2011). Distinción de los síntomas del viroide del aguacate “Rayito de sol y su manejo en Michoacán, México. Universidad Autónoma Chapingo Departamento de Fitotecnia. Academia de Fruticultura.
- Carbonell, A. (2008). Resistencia a viroides inducida por ribozimas de cabeza de martillo y RNAs interferentes (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Castellano, P. (2014). Estudio de la Compartimentalización subcelular en Viroides miembros de la familia Avsunviroidae (Doctoral dissertation).
- Cerdas, M., Montero, M., Díaz, E. (2006). Manual de manejo de pre y pos-cosecha de aguacate. Ministerio de Agricultura. San José, C.R. 48 p.
- Coatepec Harinas, México: Memoria Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX S.C. 1998-2001. Tomado el 11 de diciembre de 2009.
- Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México CESAVEM. (2008). Campaña Manejo Fitosanitario del Aguacate manejo Integrado. Boletín informativo.
- Consejo superior de investigaciones (CSI) (2010). Procedimiento para la detección simultánea de secuencias de virus mediante el uso de polisondas. Pallás Benet, V., Sánchez, J. A., Aparicio, F., y Herranz Gordo, M. D. C. Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid. Publicado 07.01.2010.
- Crisantos, C., y Manuel, J. (2011). Similitud genética del viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán, México (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados. Montecillo-México.
- Da Silva, R. (2007). Viroides. Do Centro de Patogénese Molecular (CPM) da FFUL.
- Daròs, J., Elena, S. y Flores, R. (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. EMBO. 7, 593-598.

- Derrick, K., Beretta, M., Barthe, G., Kayim, M., y Harakava, R. (2003). Identification of strains of Citrus tristeza virus by subtraction hybridization. *Plant disease*, 87(11), 1355-1359.
- Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber virus. IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*. 45, 411-428.
- Diener, T.O. (2001). The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?. *Adv Virus Res.* 57, 137-184.
- Diener, T.O. (2003). Discovering viroids a personal perspective. *Nat Rev Microbiol.* 1, 75-80.
- Ding, B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 47, 105-131.
- Ding, B. y Itaya, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact.* 20, 7-20.
- Ding, B., Itaya, A. y Zhong, X. (2005). Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Plant Biol.* 8, 606-612.
- El Comercio. (29 de Enero de 2011). *El Comercio*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2014, de El Comercio: <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/aguacate-diferentes-formas-y-sabores.htm>
- FAO. (2012). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 2014, de FAOSTAT: <http://faostat.fao.org/>.
- Flores, R. (2001). A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324(10), 943-952.
- Flores, R., Daròs, J., y Hernández, C. (2000). The Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in virus research*, 55, 271-323.
- Flores, R., Di Serio, F., y Hernández, C. (1997, February). Viroids: the noncoding genomes. In *Seminars in Virology*. Academic Press. 8 (1), pp. 65-73.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A., Daròs, J. y Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 43, 117-139.

- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A., Darós, J. y Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 43, 117-139.
- Flores, R., Randles, J., Bar-Joseph, M., y Diener, T. (2000). Subviral agents: Viroids. *Virus Taxonomy*, Seven report of the International Committee on Taxonomy Virus.
- Gas López, M^a (2007). Replicación de los viroides nucleares: motivos estructurales y enzimas implicados en el procesamiento in vivo de sus intermediarios oligoméricos. Universitat de València.
- Gómez, G., y Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleo protein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(7), 910-913.
- Gómez, G., y Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *Journal of virology*, 78(18), 10104-10110.
- Gómez, G., y Pallás, V. (2013). Viroids: a light in the darkness of the lncRNA-directed regulatory networks in plants. *The New phytologist*. 10117-10118.
- Gómez, G., Martinez, G. y Pallás, V. (2009). Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14, 264-269.
- Gómez, G., y Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleo protein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *Journal of virology*, 78(18), 10104-10110.
- Gross, H. (1978). Viroids. The structure of a new class of pathogens. *Fortschr Med.* 9, 21472149.
- Hernández S., Fernández C. C. y Baptista L.P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: McGRAW-HILL / INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- Hernández, L., Pérez, E., Pantoja, M., y Peña, I. (2014). Evaluación de dos técnicas para la detección molecular de rickettsia asociada a la enfermedad del cogollo arrepollado del papayo en Cuba. (Spanish). *Revista De Protección Vegetal*, 29(2), 82-93.

- Ibarra, D. S. (1929). El aguacate. Bib. Orton IICA/CATIE.
- Iglesia, A., Arocha, Y., Peralta, E., y Alvarez, E. (2005). Detección de *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* mediante hibridación de ácidos nucleicos no radiactiva. (Spanish). *Revista De Protección Vegetal*, 20(3), 156-160.
- Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (2001). Manejo del picudo de los cítricos. *Boletín de sanidad vegetal* 33. (P. 27).
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2007). Estudio de la Cadena Agroalimentaria de Aguacate en la República Dominicana. Secretaría de Estado de Agricultura (SEA) ,59.
- Juiña, S. (2013). Rentabilidad de aguacate, durazno, mora y tomate de árbol en Carchi, Imbabura y Tungurahua (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador. Ecuador.
- La Hora. (2 de Marzo de 2013). Le apuestan a la producción de aguacate de exportación. *Noticias Imbabura* , pág. 1.
- Loddo V., Granado C., Rodríguez M. y Labrada R. (2000). El control biológico del barrenador de la caña de azúcar. *Granma Ciencia* ,2(2), 10-20.
- Maldonado, R. (2006). Cultivo y producción de la palta, Editorial Ripalme. Lima, PE. p. 100-101.
- Marino, E. (1947). El *Copturomimus perseae* Hustache, nueva especie entomológica, grave plaga del aguacate en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía (Colombia)*, 7(26), 167-247.
- Marticorena, J., y Berrío, A. (2014). Ácaros asociados al cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill) en la Costa Central de Perú. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 38(1), 215-221.
- Martínez, G. (2011). Relación entre el silenciamiento de RNA y la patogénesis inducida por un viroide con replicación nuclear (Doctoral dissertation).

- Martínez, G., Donaire, L., Llave, C., Pallas, V., y Gómez, G. (2010). High throughput sequencing of Hop stunt viroid derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Molecular plant pathology*, 11(3), 347-359.
- Méndez, M. (2005). Caracterización molecular de variantes de secuencias del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) (Tesis doctoral). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana-Cuba.
- Murcia, N. (2009). Detección y caracterización agronómica de viroides de cítricos. Identificación y caracterización molecular y biológica de variantes del viroide del enanismo de los cítricos CDVd (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España
- Naranjo, D., Ramos, E., Espinosa, I., González, M., Vega, A., y Martínez, S. (2005). Hibridación dot-blot para la detección del virus de la viruela aviar en monocapas de la línea celular qt35 infectadas. (Spanish). *Revista De Salud Animal*, 27(1), 55-58.
- Nohales, M. (2011). Caracterización de actividades RNA ligasa implicadas en la replicación de los viroides nucleares y cloroplásticos (Doctoral dissertation).
- NORMEX DE MICHOACAN. (2012). Organismo de certificación y unidad de verificación en calidad, sanidad e inocuidad alimentaria. Recuperado el 14 de agosto de 2014, de Organismo de certificación y unidad de verificación en calidad, sanidad e inocuidad alimentari: <http://www.normich.com.mx>
- Owens, R., Blackburn, M., y Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Molecular plant-microbe interactions*, 14 (7), 905-909.
- Palukaitis, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: Investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* 158, 239–241
- Pedauy, R. (2011). Descendiendo por la escala biológica hacia la frontera y el origen de la vida: los viroides. *Virología*, 14(3), 39-69
- Pérez, J. (2008). Especies de frutales como hospedantes de viroides. Parte II. *NottCitriFrut*, (3), p. 10.

- Perugachi, G., y Sebastián, F. (2010). Influencia a la fecundación y cuajado de frutos con el uso de apiarios en plantaciones de aguacate (*Persea Americana* L.) de la variedad fuerte del tipo guatemalteco para exportación en la Provincia del Carchi.
- Picazo, I. (1982). Viroide exocortis de los cítricos (CEV): Inespecificidad de las alteraciones proteicas asociadas a la interacción viroide-huésped (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. España.
- Pillajo, C. (2013). Estandarización de una metodología de multiplicación clonal de portainjertos de aguacate (*Persea americana* Miller). Tumbaco, Pichincha (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador. Ecuador.
- Ponce, L. (2013). Caracterización de la variabilidad genética del aguacate (*Persea Americana* MILL.) de los valles interandinos del Ecuador (Doctoral disertación). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador.
- Pusir, G. P. (2013). *Gobierno Parroquial de San Vicente de Pusir*. Recuperado el 14 de Agosto de 2014, de Gobierno Parroquial de San Vicente de Pusir: <http://www.sanvicentepusir.gob.ec/inicio/index.php/la-parroquia/historia-de-la-parroquia/13-la-parroquia#>
- Randles, J. (2003). Economic impact of viroid diseases. En 'Viroids' (A. Hadidi, R. Flores, JW Randles, JS Semancik, Eds.) pp 3-11.
- Rodio, M., Delgado, S., De Stradis, A., Gómez, M., Flores, R., y Di Serio, F. (2007). A viroid RNA with a specific structural motif inhibits chloroplast development. *Plant Cell*. 19, 3610-3626.
- Romero, J., Cambra, M., Duran, N. (1995). A simple imprint-Hybridization method for detection of viroids. *J. Virol. Methods* 55:37- 47.
- Ruiz, P. (2001). Metodología de la investigación. Santafé de Bogotá: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Saucedo, J. (2013). Efecto del viroide de la mancha de sol en el rendimiento y calidad de frutos en aguacate de Michoacán (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados. Montecillo-México.

- Semancik, J., y Szychowski, J. (1994). Avocado sunblotch disease: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *The Journal of general virology*, 75, 1543-1549.
- Semancik, J. (2003). Avocada sunblotch viroid In: Viroids Hadidi, A, Flores, R, Randles, J.W. and Semancik, J.S. (Eds). *SCIRO Publishing* pp. 171-177.
- SENASICA. (2012). Manual Técnico de muestreo de productos agrícolas para determinar residuos de plaguicidas. Recuperado el 1 de Agosto de 2014, de Secretaria de agricultura, ganaderia, desarrollo rural, pesca y alimentación: <http://www.senasica.gob.mx>.
- Seoane, P. (2011). Obtención y validación de la sonda molecular del Viroide Tubérculo Ahusado de la papa (PSTVd) para la detección en análisis masivos (Tesis de grado). Universidad de la República. Uruguay.
- Serra, A. (2009). Estudios de Patogenicidad de Viroides del Género Apscaviroide y Hostuviroide en cítricos (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia. España.
- SINAGAP. (2002). Superficies y producción de aguacate. Obtenido de III Censo Nacional Agropecuario (CNA): <http://sinagap.agricultura.gob.ec/index.php/using-joomla/extensions/languages>.
- Singh, R. (1983). Viroids and their potential danger to potatoes in hot climates. *Canadian Plant Disease Survey*, 63(1), 13-18.
- Singh, R. (1990). Techniques in the study of viroids diseases of tropical and subtropical plants. *Review of Tropical Plant Pathology*. Vol 6: Techniques and Plant Quarantine, 6, 81.
- Singh, R. (1986). Viroids their nature and biology. Ed. Por Varma, A; Verma, JP. *Vistasin Plant Pathology*. Malhotra Publishing house. New Delhi. P. 549-566.
- Singh, R., y Fernow, K. (1980). Tubérculo ahusado. En compendio de Enfermedades de la papa. W. J. The American Phytopathological Society.(Hooker, Ed.) St Pau, Minnesota.

- Sosa, C., Perdomo, F., Brathwaite, C., y Salazar, J. (1997). Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas: diagnóstico fitosanitario II (No. IICAH20-31). IICA, México, DF (México).
- Soto, M., Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria; González, L., Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria; Peralta, E., Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. In: Revista de Protección Vegetal. Ene-Abr 2000. v. 15(1) p. 56-59.
- Suárez, E. (2005). El viroide de la mancha del sol (ASBVd) es persistente en cultivos nucelares de aguacate (*Persea americana* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 10-18, feb. 2007. ISSN 1909-8758. Disponible en: <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/490>
- Symons, R. (1981). Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. Nucleic Acids Res. 9, 6527-6537.
- Tabler, M. y Tsagris, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. Trends Plant Sci. 9, 339-348.
- Tokar, M. 2008. Variedades de aguacate, Primer Seminario Taller Internacional de Aguacate Hass., Ibarra, EC. p.5
- Tsagris, E., Martínez de Alba, A., Gozmanova, M. y Kalantidis, K. (2008). Viroids. Cell Microbiol. 10, 2168-2179.
- UC PMG (University of California Pest Management Guidelines). (2001). Avocado sunblotch pathogen: avocado sunblotch viroid (ASBVd). Recuperado: University of California. (onlinea: <http://www.ipm.ucdavis.edu/pmg/r8101011.html>)
- University of California. (2001). Avocado sunblotch pathogen: avocado sunblotch viroid (ASBVd). Recuperado de <http://www.universityofcalifornia.edu/>
- Vaca, J., Jhon, B., y López, K. (2011). Detección, identificación y localización geográfica de Begomovirus que afectan al tomate en Colombia. (Spanish). Revista Colombiana De Biotecnología, 13(1), 115-122.
- Vallejo, M. (2011). Histopatología, fisiología y calidad postcosecha de frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. 'Hass' infectados con el avocado sunblotch viroid (ASBVd)

y diagnóstico de la enfermedad (Tesis doctoral).Colegio de Postgraduados Montecillo-México

Zhu, Y., Green, L., Woo, Y., Owens, R., y Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279, 69–77.

ANEXOS

Anexo 1. Detección de virus mediante el uso de polisondas de hibridación no radiactivas.

Una vez concluido el estudio del *Avocado sunblotch viroid* y con el conocimiento de los resultados negativos para la presencia del viroide, además considerando que las plantas estudiadas presentaban síntomas de enfermedad y con la intuición de que las manifestaciones observadas podían estar siendo atribuidas por un virus a una de las membranas se la expuso al análisis con una polisonda contenía la secuencia de los siguientes virus CMV, ToMV, PVY, TSWV, PepMV, PMoV, AMV, TEV, TOTV, ToCV, TiCV, TYLCV (IS), TYLCV (Sar), EMDV y ToLCNDV. El procedimiento de hibridación molecular es similar al empleado anteriormente para la detección del ASBVd, con la diferencia que la sonda utilizada en este ensayo, posee segmentos enlazados de los genomas de 15 virus diferentes.

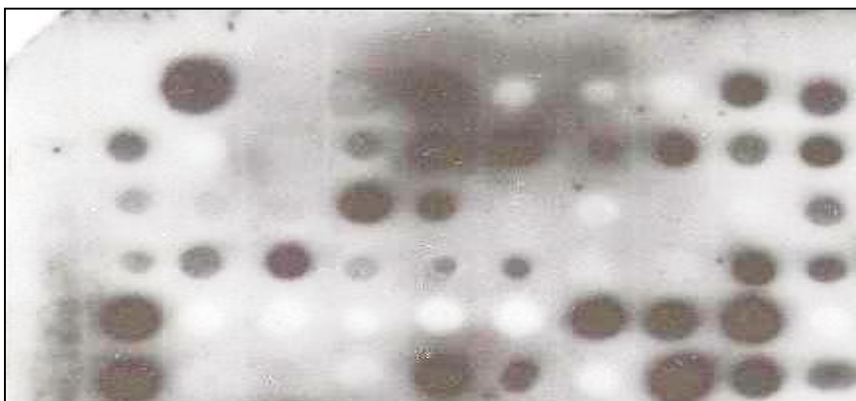
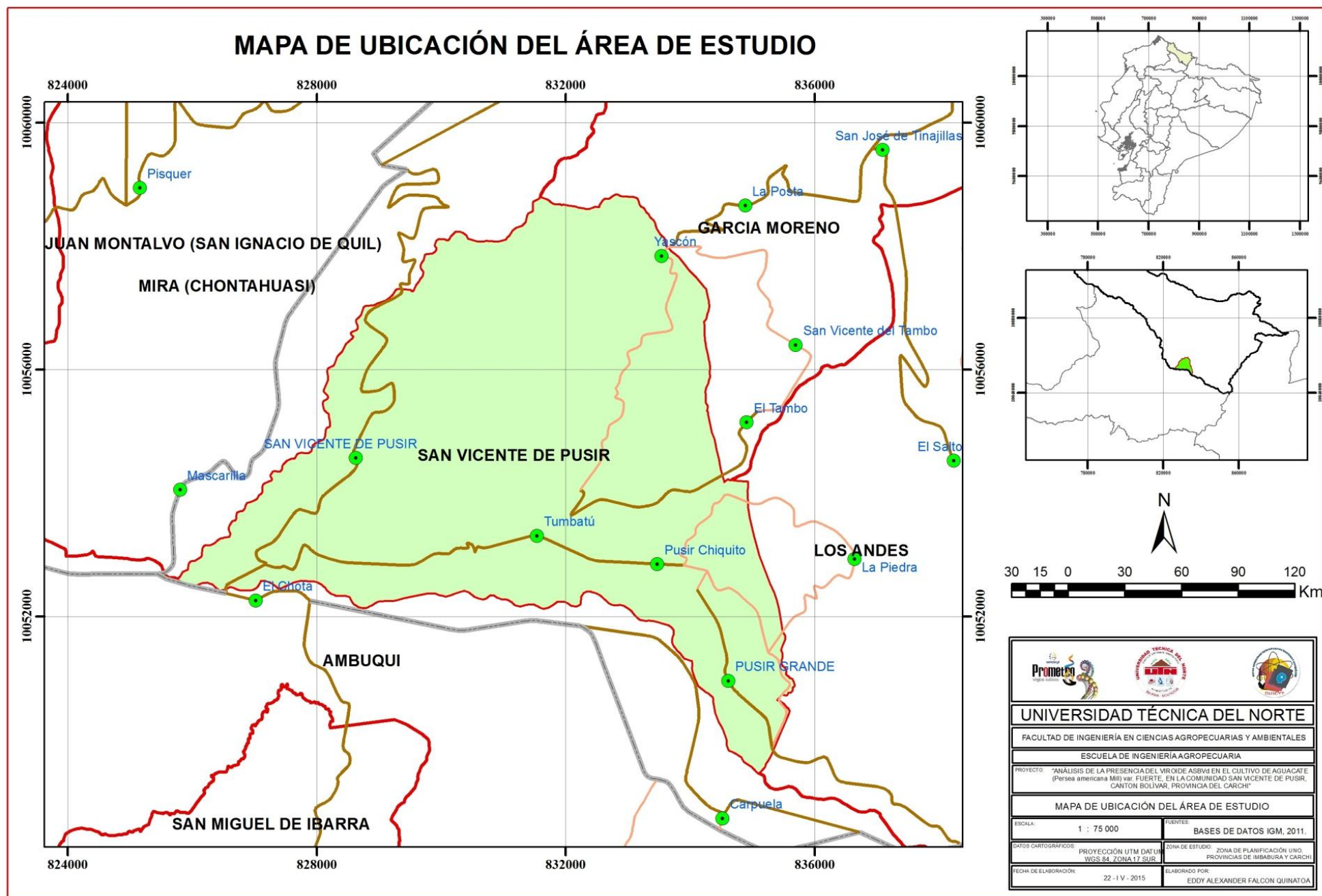


Figura 10. Placa de revelado obtenida de la hibridación de la polisonda. Los puntos negros indican la señal positiva de la hibridación.

Finalizada la etapa de hibridación y como se puede observar en la figura 10. El 16% de las muestras analizadas resultaron positivas para al menos uno de los quince virus que conformaba la polisonda. Este resultado posee una gran relevancia ya que permite sugerir que los síntomas observados en las plantaciones aguacateras durante el proceso de muestreo y resto de este estudio puedan ser consecuencia de los efectos patológicos inducidos por algunos de estos patógenos virales en la planta.

Anexo 2. Ubicación del área de estudio.



FOTOGRAFIAS

SOCIALIZACIÓN Y RECORRIDOS EN EL ÁREA DE ESTUDIO

Foto 1.Charla de socialización



Foto 2. Recorridos en campo



RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Foto 3. Identificación de árboles



Foto 4. Recolección de follaje



Foto 5. Empaque del tejido vegetal



Foto 6. Identificación de la muestra



PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Foto 7. Descongelación de muestras



Foto 8. Homogenización y pesaje



Foto 9. Bolsa con tejido



Foto 10. Tejido triturado



Foto 11. Ácidos nucleicos



Foto 12. Inmovilización de ácidos nucleicos

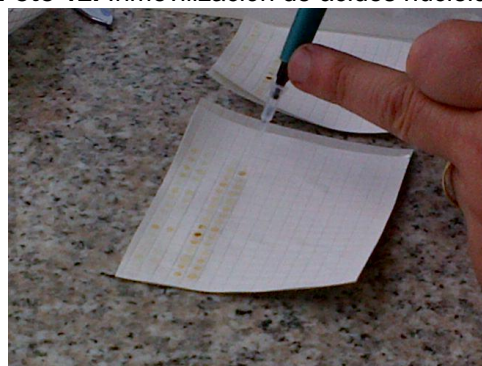


Foto 13. Corte del fruto



Foto 14. Impresión de frutos



HIBRIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Foto 15. Tampón pre hibridación



Foto 16. Membrana de nylon



Foto 17. Tubo de hibridación

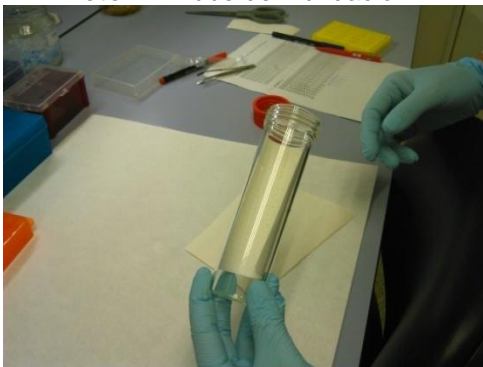


Foto 18. Tambor de hibridación



Foto 19. Horno de hibridación



Foto 20. Hibridación de la membrana

